



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DISEÑO DE UN BIORREACTOR ENZIMÁTICO PARA LA  
TRANSFORMACIÓN DE ACEITE DE OLIVA A BIODIESEL UTILIZANDO  
LIPASA DE *Rizophus oryzae*.**

**“Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología”.**

**Profesor guía**

**Ing. Santiago Zárate Baca.**

**Autor**

**Francis Daniel Moncayo Izurieta.**

**Año**

**2015**

### **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

**“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.**

---

**Santiago Zárate Baca**

**Ingeniero en Biotecnología**

**C.I: 171897484-1**

### DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Francis Daniel Moncayo Izurieta

C.I: 171823992-2

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este trabajo no hubiera sido posible sin la diligencia, apoyo, paciencia y consejo de mis mentores; así como el amor y motivación incondicionales recibidos de mi familia más cercana. A todos ustedes, mi más sentido agradecimiento por apoyarme en la consecución de mis sueños y ambiciones.**

## **DEDICATORIA**

**Este trabajo está dedicado a todas las personas que buscan sembrar el cambio en el planeta, demostrando que es posible encontrar maneras de aprovechar los recursos que nuestro.**

## RESUMEN

El biodiesel es un biocombustible para reemplazar derivados del petróleo como fuente energética renovable y de menor impacto ambiental. Es obtenido principalmente por vía química, de alto impacto ambiental. El biodiesel puede obtenerse también por vía enzimática, que genera menos subproductos, sin embargo es difícil de controlar y costosa por el uso de enzimas, y su aplicación es restringida. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de producción de biodiesel mediante el uso de enzimas inmovilizadas, en distintas configuraciones de reactores, para aumentar la eficiencia del proceso. Se consideró tres modos de operación de biorreactores: discontinuo (batch), continuo (CSTR, por sus siglas en inglés Continuous Stirred Tank Reactor) y de flujo pistón (PFR, por sus siglas en inglés Plug Flow Reactor), este último con una configuración de una y dos etapas, para determinar cuál de ellos demuestra el mejor comportamiento para la transesterificación enzimática. Mediante modelación se evaluó el comportamiento de la reacción en los modos de operación mencionados, y se comparó el porcentaje de conversión de sustrato a biodiesel. Como parámetro de comparación se consideró al tiempo de residencia. Según el modelo propuesto, la configuración que mostró la mayor conversión en el menor tiempo de residencia fue el PFR. Para comprobar la información de los modelos teóricos, se construyeron los biorreactores batch, y PFR en I y II etapas, donde se produjo biodiesel, utilizando lipasa comercial de *Rhizopus oryzae* inmovilizada por entrecruzamiento covalente con glutaraldehído, utilizando aceite de oliva extra virgen. Para obtener el porcentaje de conversión de triglicéridos a biodiesel, se midió el volumen de glicerol producido en cada reactor para obtener el porcentaje de triglicéridos convertidos a biodiesel, además se calculó la productividad volumétrica  $Q_p$ , para apoyar los resultados de la medición del glicerol. El volumen de glicerol y  $Q_p$  obtenido del batch, PFR I y II etapas, fue de 1.62, 3.52, 3.62 mL, y 29.32, 7.91, 11.58 g/L.h respectivamente. El porcentaje de triglicéridos convertidos en batch, PFR I y II etapas fue de 74.31%, 48.35% y 49.90%, siendo en batch donde se produjo el mayor porcentaje de conversión en el mismo tiempo de residencia (30 h).

## ABSTRACT

Biodiesel is a biofuel intended to replace petroleum derivatives, and as a source of renewable energy with less environmental impact. It's obtained mostly via chemical catalysis, an easy but high environmental impact method. Biodiesel also can be obtained by enzymatic method, but it's difficult to control and costly because of the usage of enzymes, and with limited applications. The objective of the present study was to develop a method of biodiesel production using immobilized enzymes, on different reactor configurations, in order to increase the process efficiency. Three bioreactor operational modes were considered: batch, Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR), and Plug Flow Reactor (PFR), the former with a one stage and two stages configuration, in order to determine which of them behaves the best for the enzymatic transesterification reaction. Using modeling analysis the reaction behavior of the mentioned operational modes was assessed, and the conversion percentage of biodiesel from oil was compared. Residence time was used as a comparison parameter. According to the proposed model, the reactor configuration that showed the highest conversion level and the least residence time was the PFR operational mode. In order to test the truthfulness of the theoretical models, batch, CSTR and I and II stage PFR bioreactors were constructed, and biodiesel was produced on them, using *Rhizopus oryzae* commercial lipase which was immobilized by covalent crosslinking with glutaraldehyde, from extra virgin olive oil. To obtain the conversion percentage from triglycerides to biodiesel, a measurement of glycerol volume produced in each reactor was registered in order to obtain the percentage of triacylglycerides converted to biodiesel. Furthermore, the volumetric productivity  $Q_p$  was calculated in order to support the results from the glycerol measurements. The glycerol volume and  $Q_p$  obtained from batch, I and II stage PFR was 1.62, 3.52, 3.62 mL and 29.32, 7.91, 11.58 g/L.h respectively. The percentage of triacylglycerides converted in batch, I and II stage PFR was 74.34%, 48.35%, and 49.90%, being the batch reactor the one which achieved the higher conversion percentage in the same residence time (30h).

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Formulación del problema.....	4
1.3 Justificación .....	5
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos .....	7
<b>CAPITULO II. MARCO TEORICO</b> .....	9
2.1 Biodiesel .....	9
2.1.1 Métodos de producción de biodiesel.....	10
2.1.1.1 Transesterificación.....	10
2.1.1.2 Métodos de producción químicos de biodiesel .....	12
2.1.1.2.1 Proceso catalizado por una base .....	12
2.1.1.2.2 Proceso catalizado por un ácido .....	13
2.1.1.3 Método enzimático de producción de biodiesel .....	14
2.2 Inmovilización enzimática.....	16
2.3 Factores físico-químicos a considerar en el método enzimático de producción .....	19
2.3.1 Selección de alcohol y proporción molar aceite: alcohol.....	19
2.3.2 Selección de solventes orgánicos.....	20
2.3.3 Actividad y contenido de agua en la reacción .....	21
2.3.4 Temperatura de reacción.....	22
2.4 Modelos cinéticos .....	23
2.5 Mecanismos de reacción enzimáticos.....	26
2.5.1 Inhibición enzimática.....	26
2.6 Reactores enzimáticos.....	28

2.6.1 Reactor de tanque agitado por lote discontinuo (batch) .....	29
2.6.2 Reactor continuo de tanque agitado (CSTR) .....	32
2.6.3 Reactor de flujo pistón de lecho empacado (PFR) .....	34

## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....**

**38**

3.1 Etapa I: modelación .....	39
3.1.1 Balance de masa para reactor de tanque agitado por lote discontinuo (Batch) .....	43
3.1.2 Balance de masa para reactor de tanque agitado en modo continuo (CSTR) .....	44
3.1.3 Balance de masa para reactor de flujo pistón de lecho empacado (PFR) .....	45
3.2 Etapa II: experimentación.....	47
3.2.1 Inmovilización enzimática .....	47
3.2.2 Producción de biodiesel (transesterificación).....	49
3.2.2.1 Modo de operación de tanque agitado por lote discontinuo .....	51
3.2.2.2 Modo de operación de flujo pistón de lecho empacado (PFR).....	52
3.2.3 Medición cuantitativa de glicerol .....	53
3.2.4 Cálculo de productividad volumétrica $Q_p$ .....	53

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....**

**55**

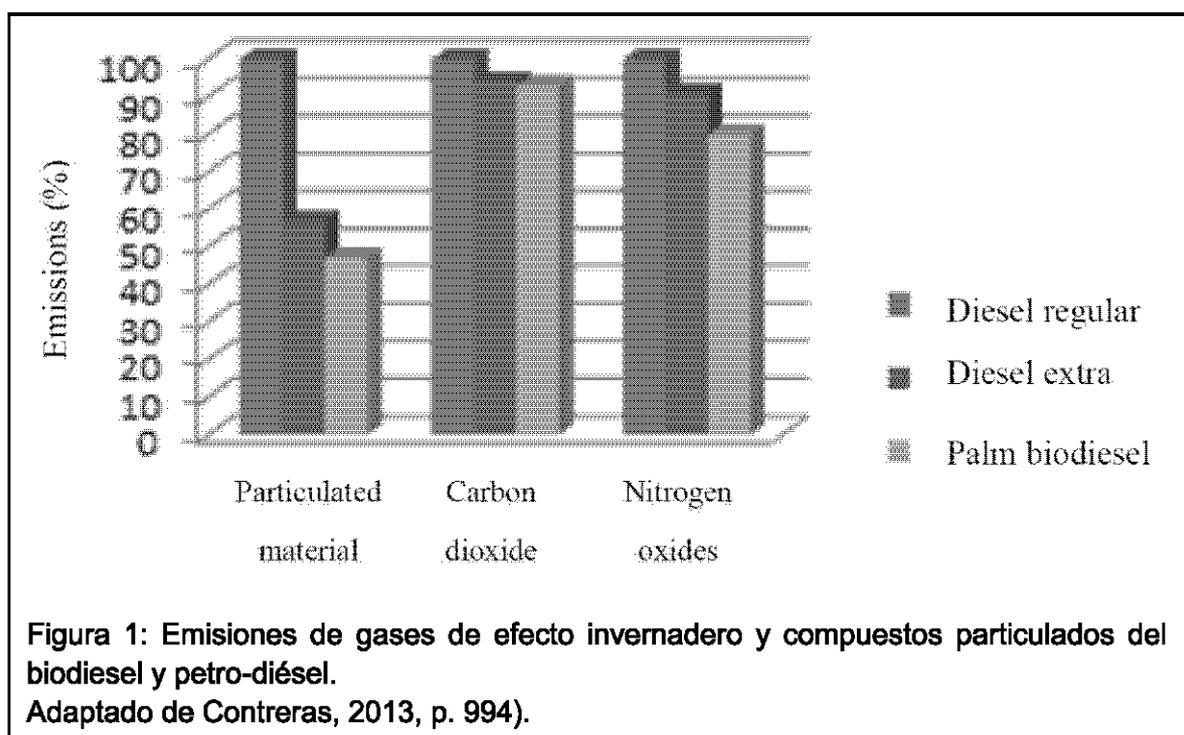
4.1 Modelación teórica de reactores.....	55
4.2 Producción de biodiesel.....	59
4.3 Cantidad de glicerol producida como indicador del porcentaje de conversión del biodiesel .....	61
4.4 Modelación en reactor tipo batch y producción de biodiesel .....	64
4.5 Modelación en reactor tipo CSTR .....	65

4.6 Modelación en reactor tipo PFR y producción de biodiesel .....	66
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
5.1 Conclusiones .....	69
5.2 Recomendaciones .....	70
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>78</b>

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El biodiesel es un biocombustible que ha surgido como una alternativa prometedora para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEE) a la atmósfera (figura 1), siendo un producto más seguro que los derivados del petróleo, es decir, en caso de existir un derramamiento de biocombustible en el océano, es seguro que este tendría un efecto adverso en la fauna y flora adyacente, sin embargo, el orden de magnitud del impacto sería mucho menor, y al tratarse de biocombustibles, sus componentes son moléculas de origen biológico, lo que implica que microorganismos presentes en el área puede aprovecharlas y la intensidad del siniestro pronto sería amortiguada y superada (Biofuel.org.uk, 2010).



El biodiesel, es un biocombustible producido a partir de materia orgánica de origen biológico, p. ej., grasas vegetales y animales, cuya ventaja más notable

es ser un combustible biodegradable (Vembanur, Lakshmi y Muthukumar, 2007, pp. 3975-3981). Gran parte de la producción de biodiesel, se realiza siguiendo protocolos que utilizan catalizadores químicos, p. ej., de origen alcalino como el KOH y el NaOH. El biodiesel obtenido por medios químicos, necesita ser posteriormente tratado para eliminar el glicerol formado, además de los catalizadores alcalinos, procedimiento que resulta tedioso y costoso (Shimada, Watanabe, Sugihara y Tominaga, 2001, pp. 133-134).

Una alternativa viable para el problema anterior es el uso de enzimas, especialmente de las lipasas, como una metodología alternativa para la producción de biodiesel, que sea amigable con el medio ambiente, pues los catalizadores químicos son reemplazados por enzimas. El glicerol producido es fácilmente extraído, y no existe la necesidad de realizar tratamientos posteriores, evitando producir aguas residuales contaminantes como en los procesos químicos (Al-Zuhair, Ling y Jun, 2007, pp. 951-952).

Las enzimas utilizadas para obtener biodiesel se denominan lipasas, tienen una amplia aplicación industrial, y son obtenidas de cepas bacterianas, p. ej., lipasas de *Bacillus prodigiosus*, y más recientemente, de eucariotas como los hongos, p. ej., *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, y *Candida antarctica*. Las enzimas obtenidas de este último, son las más utilizadas para la producción de biodiesel, catalizando la transesterificación de aceites, sean estos vegetales, como el aceite de oliva, aceite de palma, aceite de semillas de algodón, o residuales, por ejemplo, los aceites de desperdicio provenientes de restaurantes, y plantas procesadoras (Rivera-Pérez y García-Carreno, 2007, pp. 38-41).

La producción de biodiesel se lleva a cabo en contenedores denominados biorreactores enzimáticos, que pueden clasificarse por su modo de operación: discontinuos, continuos, de flujo pistón, entre otros (Illanes y Altamirano, 2008, pp. 205-207). La elección de una configuración particular de estos reactores es de gran importancia si la finalidad es un alto rendimiento de producto (biodiesel), la eliminación continua del glicerol, y la reducción en la cantidad de

unidades operativas (Chesterfield, Rogers, Al-Zaini y Adesina, 2012, pp. 101-102).

Según la configuración establecida, p. ej., reactor de tanque agitado continuo, es necesario un diseño ingenieril avanzado, donde es necesario el desarrollo de modelos matemáticos que tengan en cuenta parámetros fundamentales como la actividad enzimática, corrientes de flujo, pH y la temperatura del medio, entre otros. Desafortunadamente, las condiciones de reacción pueden ser muy variables y difíciles de controlar, especialmente cuando se realiza un escalamiento de la producción a nivel industrial (Illanes y Altamirano, 2008, pp. 205-209).

Además del diseño de una configuración de biorreactor adecuada, es importante preservar la integridad y propiedades catalíticas de las enzimas. La metodología más utilizada para garantizar que la estabilidad y actividad enzimática no se vea afectada, es la inmovilización. Se entiende por inmovilización enzimática al proceso por el cual las enzimas son adheridas o inclusive atrapadas en un soporte sólido. Este procedimiento provee de un sinnúmero de ventajas al proceso, entre ellas la posibilidad de reutilizar un número considerable de veces al mismo surtido de enzimas sin que pierdan su actividad enzimática, la fácil separación de la enzima y el producto, y evitar las altas concentraciones de glicerol, que reduce la actividad enzimática, y cuya presencia es inevitable en la transesterificación de aceites vegetales (Ghaly, Dave, Brooks y Budge, 2010, p. 61).

El biodiesel producido por catálisis enzimática es una solución alternativa atractiva, pero desafortunadamente, ahí es donde recae el cuestionamiento frente a este proceso: el uso de enzimas. Una de las máximas en la industria es el desarrollo de procesos y materiales a un bajo costo y que provean una ganancia máxima. Para dar una idea, el costo de las lipasas y la inmovilización de estos, significa más del 90% del total que supone la producción de biodiesel, razón por la cual el proceso todavía no es muy popular a nivel industrial (Ghaly et al, 2010, pp. 59-61).

## 1.2 Formulación del problema

Hoy en día, una de las problemáticas de nuestra sociedad es la explotación y uso masivo de combustibles fósiles, ya que promueven el calentamiento global principalmente por la emisión de gases de efecto invernadero como el CO<sub>2</sub> y SO<sub>x</sub>, los cuales son generados por máquinas, fábricas y medios de transporte. Cabe señalar que el aumento de la demanda de combustibles fósiles, es proporcional al crecimiento demográfico mundial. A este hecho se añade que los combustibles fósiles son una fuente no renovable de energía, de modo que es necesario plantear alternativas que, además de satisfacer las necesidades energéticas de la civilización, sean amigables con el medioambiente, y que eventualmente logren suplantar a los combustibles fósiles (Janusz, Zelazna, Karwowska y Olba-Ziety, 2012, pp. 15-25).

El biodiesel no es un concepto nuevo, sin embargo, los procedimientos industriales utilizados para producirlo, especialmente la catálisis alcalina, necesita de etapas previas a la producción de biodiesel, donde se añaden catalizadores ácidos para esterificar a los ácidos grasos libres (FFA por sus siglas en inglés) con el fin de evitar la saponificación, lo que a su vez produce una cantidad enorme de aguas residuales (0.2 toneladas de agua residual por tonelada de biodiesel producido), que en consecuencia necesitan ser tratadas para evitar contaminar fuentes de agua limpia. Todo este proceso supone un problema en cuanto a consumo de energía y contaminación ambiental se refiere (Fjerbaek, Christensen y Norddahl, 2009, p. 1304.).

No obstante, existen métodos de producción de biodiesel que evitan el derroche de energía, y son amigables con el ambiente. Es el caso de la catálisis enzimática, con la cual pueden obtenerse rendimientos cercanos al 100% en tiempos muy cortos (generalmente minutos u horas) (Fjerbaek et al, 2009, p. 1304). Desafortunadamente, uno de los mayores obstáculos al momento de utilizar enzimas para producir biodiesel, es su elevado costo, además del precio de este producto comparado con los derivados de combustibles fósiles, como el petrodiesel (Murty et al, 2002, p. 65).

Por tales razones, el enfoque actual se encuentra en desarrollar procesos que involucren la menor pérdida de enzima del sistema. La producción de biodiesel en reactores con enzimas inmovilizadas es un claro ejemplo de ello. Sin embargo, existen muchos factores que deben considerarse al momento de diseñar estos procesos. Por ejemplo, el tipo de inmovilización enzimática, la proveniencia de la enzima, el modo de operación y la configuración de los reactores. El análisis de tales factores es fundamental para obtener el mayor rendimiento posible de la reacción, evitar pérdida de catalizador y permitir una producción continua a un costo económico (Ribeiro et al, 2011, pp. 9-10).

### **1.3 Justificación**

Este proyecto nace de la necesidad apremiante de encontrar mecanismos que generen fuentes energéticas alternativas debido al uso cada vez más limitado de recursos naturales, de la creciente contaminación ambiental que supone la actividad industrial para obtenerlos y de la necesidad de contar con sistemas productivos eficientes.

Para que la producción de un biocombustible se considere factible, debe cumplir requisitos como el proveer de una ganancia neta de energía, su uso debe brindar beneficios al ambiente, debe ser competitivo económicamente, y su producción debe ser continua y en grandes cantidades sin poner en peligro la seguridad alimenticia en el planeta. El biodiesel cumple gran parte de estos requisitos, por ejemplo, la energía obtenida del petrodiesel es apenas mayor (43 MJ/kg combustible quemado) que la obtenida del biodiesel (38 MJ/kg combustible quemado). Además, el biodiesel rinde 93% más energía que la que es invertida en su producción (Hill et al, 2006, p. 11206). Su impacto ambiental es leve, pues las emisiones de gases de efecto invernadero son reducidas en un 40% (Contreras, Sierra y Guerrero, 2013, p. 994). Si bien la producción de biodiesel involucra el uso de extensas áreas agrícolas, y puede entrar en competencia directa con el área destinada para alimentación, existen sustratos alternativos excelentes, como las algas, que son excelentes secuestradores de CO<sub>2</sub> (UNCTAD, 2009, pp. 15-21; Takahashi, 2011), al igual

que el arbusto *Jatropha curcas*, el cual no es comestible y puede ser cultivado en zonas no aptas para la agricultura convencional (UNCTAD, 2009, pp. 91-99), además, estudios han demostrado que a partir de los aceites de este arbusto, pueden obtenerse rendimientos de biodiesel de hasta 94% utilizando enzima inmovilizada (Kumari, Mahapatra, Garlapati y Banerjee, 2009, p.1).

Si bien es cierto que el biodiesel todavía no puede competir económicamente con su contraparte fósil, es parte de una industria en constante crecimiento. Por ejemplo, sólo en Europa, la producción de biodiesel se incrementó en un 5.5% del 2009 al 2010, y un 10.06% del 2010 al 2011 (European Biodiesel Board, 2013), y se estima que la demanda potencial de este producto en Europa para el 2022 será de 6.3 billones de galones, los cuales deberán representar al menos el 7% del total de combustibles producidos (UNCTAD, 2009, pp. 1-13), de modo que el objetivo primordial es desarrollar mecanismos o procesos que hagan de la producción de biodiesel una industria competitiva.

Los procesos de conversión de aceite a biodiesel se llevan a cabo en contenedores denominados reactores. En estos dispositivos, las enzimas pueden encontrarse en forma libre o inmovilizada (Fjerbaek et al, 2009, p. 1308). El uso de enzimas inmovilizadas tiene un gran valor en la producción de biodiesel, pues se evita el desperdicio de enzimas al terminar cada proceso. La inmovilización por enlace covalente es ampliamente utilizada para tal fin por los enlaces estables y fuertes entre la enzima y el transportador, y debido a que la enzima no necesita estar presente en el producto (Nisha, Karthick y Gobi, 2012, p. 148).

A nivel industrial, no obstante, el uso de reactores conlleva una serie de inconvenientes, generalmente relacionados con la baja productividad, altos costos de producción, caída de presión y pérdida de actividad catalítica, sin mencionar un producto muy variable en cuanto a calidad (Ríos, Belleville, Paolucci y Sanchez, 2004, p. 189). Por tal razón es de vital importancia considerar la configuración y modo de operación del reactor que más se ajuste a los objetivos del proceso. Además de la selección del reactor, al momento de escalar el proceso a nivel industrial, hay que tener en consideración las

interacciones entre las enzimas y el ambiente físico-químico del reactor, al igual que los efectos causados por la variabilidad de temperatura debido al cambio en la relación entre la superficie y el volumen en el reactor, el pH, el estrés mecánico por agitación, el tiempo de mezcla, y el riesgo de contaminación (Tufvesson, Fu, Skibsted y Woodley, 2010, pp. 6-7).

Es necesario notar que debido a lo costoso y tedioso que resulta la experimentación en reactores, especialmente para escalar los procesos, se opta por desarrollar modelos matemáticos, herramienta fundamental para describir y predecir el comportamiento de un proceso biotecnológico (Tufvesson et al, 2010, p. 8). Particularmente útiles son los modelos matemáticos para diseñar reactores y decidir la manera más adecuada en la que estos deben ser operados para obtener el mayor desempeño posible sin el desgaste innecesario de recursos y permitiendo a la vez descartar las configuraciones y modos de operación menos eficientes (Bailey, 1998, p. 8).

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Diseñar un reactor enzimático para la producción de biodiesel utilizando lipasa comercial inmovilizada de *Rhizopus oryzae* para la transesterificación de aceite de oliva.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

\*Evaluar teóricamente la eficiencia de conversión de aceite de oliva a biodiesel en reactores enzimáticos con diferentes configuraciones y modos de operación.

\*Aplicar un método de inmovilización de la lipasa para su implementación en el ensamblaje de los reactores enzimáticos.

**\*Diseñar y construir el reactor enzimático que muestre el porcentaje de conversión teórico mayor.**

**\*Determinar experimentalmente la eficiencia de conversión de los reactores enzimáticos seleccionados para la conversión de aceite de oliva en biodiesel.**

## **CAPITULO II. MARCO TEORICO**

### **2.1 Biodiesel**

En la actualidad, un porcentaje significativo de las actividades humanas dependen en forma directa de la energía obtenida a partir de combustibles fósiles p. ej., más del 80% de la energía primaria depende de combustibles fósiles, donde el sector de transporte/ automotriz ocupa el 58%, y según estimaciones, en los siguientes diez años, la demanda de combustibles se elevará a más del 40% (Contreras et al, 2013, pp. 993-994). Para contrarrestar estos inconvenientes, se han realizado esfuerzos internacionales para promover el uso de biodiesel, especialmente para suplir el sector automotriz (Su y Wei, 2008, p. 118), y para asistir al problema de contaminación ambiental debido a la emisión de gases nocivos que promueven al calentamiento global, procedentes de la combustión de gasolina y de otros combustibles fósiles (Janusz et al, 2012, pp. 15-17).

El biodiesel se destaca por su creciente y extensa popularidad en el sector industrial. Cabe señalar que este biocombustible es de fácil obtención, y puede utilizarse un sinnúmero de compuestos como materia prima para su producción, tal es el caso de los aceites vegetales como el de soya, girasol, palma, colza, y oliva (Bajpai y Tyagi, 2006, p. 488).

El biodiesel no es un concepto nuevo, pues se tiene constancia de que la transesterificación de aceites vegetales fue practicada en 1853 por los científicos E. Duffy y J. Patrick. Sin embargo, el alemán Rudolph Diesel a principios del siglo XX, fue el primero en utilizar un aceite vegetal como fuente de combustible para hacer funcionar uno de los primeros motores a base de combustible líquido. Sin embargo, a partir de la década de 1920, se evidenció que los combustibles derivados de petróleo, principalmente por su bajo costo de producción y rentabilidad, tendrían preferencia por sobre los combustibles de origen vegetal (Bajpai y Tyagi, 2006, pp. 496-499).

A pesar de las ventajas económicas de los combustibles derivados del petróleo, el agotamiento de sus reservas, además de cuestiones políticas, económicas, y ambientales, exigen soluciones rápidas y efectivas al problema de demanda energética mundial. El biodiesel nuevamente es considerado una de las opciones más atractivas para solucionar, al menos parcialmente, la demanda energética mundial, principalmente en lo que respecta a los sectores industriales y automotrices. Actualmente, los mayores consumidores de biodiesel son Canadá y Estados Unidos, que juntos representan un consumo de alrededor del 22% del total (Ghaly et al, 2010, pp. 54-55).

### 2.1.1 Métodos de producción de biodiesel

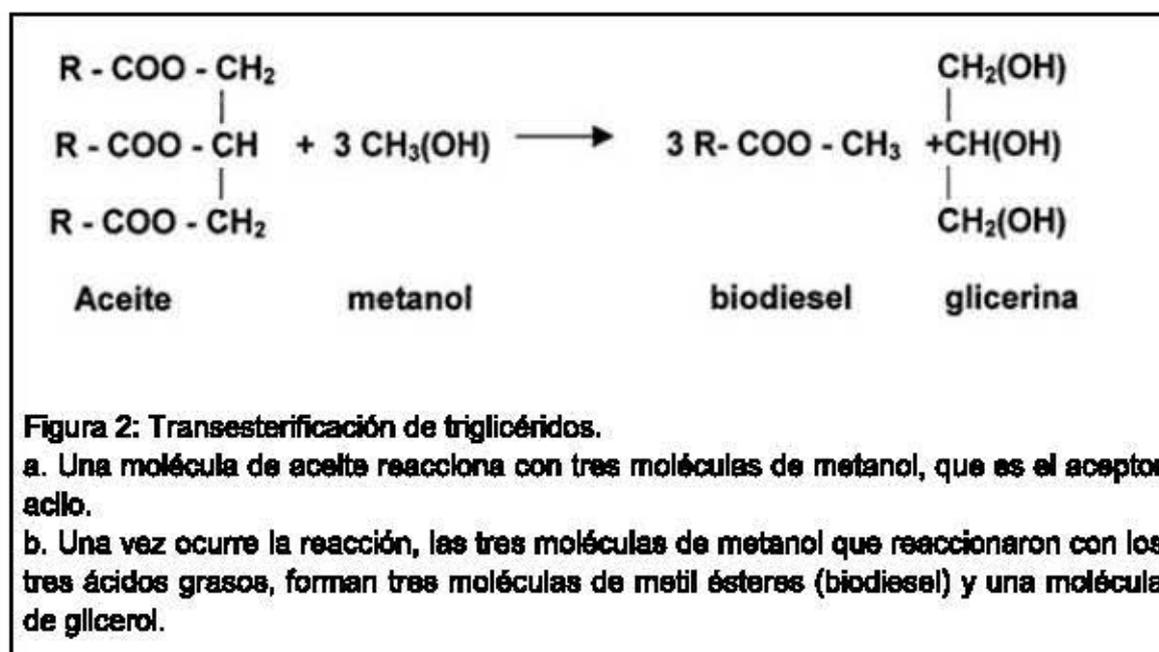
Existen algunos métodos reconocidos para la producción de biodiesel, entre ellos la pirolisis, microemulsificación y transesterificación (Ghaly et al, 2010, pp. 55-57), sin embargo, en esta revisión se considerará solamente al método más simple, ecológicamente amigable y eficiente de los tres: la transesterificación de ácidos grasos (Meher, Vidya Sagar y Naik, 2004, p. 251).

#### 2.1.1.1 Transesterificación

Se denomina transesterificación al conjunto de reacciones orgánicas donde una molécula de éster ( $R-COO-R'$ ), es transformada en otra molécula de éster, mediante el intercambio con un grupo alcoxi (grupo alquilo unido a una molécula de oxígeno:  $-RO$ ). Cuando la molécula de éster reacciona con alcohol, la reacción se denomina alcoholisis (Schuchardt, Sercheli y Vargas, 1998), es decir, se desplaza una molécula de alcohol de la molécula de éster original, siendo un proceso muy parecido a la hidrólisis, como se muestra en la ecuación 1:



En la producción de biodiesel, la especie de alcohol más utilizada es el metanol, en un proceso llamado metanólisis (Meher et al, 2004, pp. 255-257), que reacciona de forma reversible con los triglicéridos de los aceites vegetales o residuales, para formar ésteres y glicerol. Cabe señalar que, como se trata de un proceso reversible, es necesario romper el equilibrio hacia la formación de los productos con la adición de una cantidad excesiva de alcohol (p .ej., metanol) (Ghaly et al, 2010, pp. 64-65). La transesterificación de triglicéridos se da en tres pasos consecutivos (figura 2): conversión de triglicéridos (aceite) a diglicéridos, conversión de diglicéridos a monoglicéridos y por último, conversión de monoglicéridos a glicerol.



La transesterificación puede ocurrir de manera pasiva, es decir, mediante la simple mezcla de los reactantes, pero la reacción procede lentamente, y para que el biodiesel pueda ser producido a nivel industrial, es necesario acelerar la velocidad de la reacción con la adición de un catalizador. Actualmente, existen dos métodos de producción de biodiesel basados en el uso de catalizadores

químicos, como los catalizadores alcalinos y ácidos; y catalizadores enzimáticos (Schuchardt et al, 1998, p. 200).

### **2.1.1.2 Métodos de producción químicos de biodiesel**

Los métodos químicos para la producción de biodiesel se dividen en dos principales: el proceso catalizado por una base y el proceso catalizado por una especie ácida.

#### **2.1.1.2.1 Proceso catalizado por una base**

La transesterificación mediada por una base es el método más utilizado para producir biodiesel a nivel industrial, debido tanto a la rapidez del proceso comparada con el método de catálisis ácida, como a la menor corrosividad que presentan los catalizadores básicos con respecto de los ácidos. Entre los catalizadores básicos más utilizados se encuentran los alcóxidos, hidróxidos y carbonatos de sodio y de potasio. Los alcóxidos, como el metil nitrito ( $\text{CH}_3\text{ON}$ ), son los más atractivos al momento de realizar consideraciones sobre el rendimiento deseado de biodiesel, pues se ha demostrado que a concentraciones muy pequeñas, y en tiempos de reacción relativamente cortos (alrededor de 30 minutos), el rendimiento obtenido de biocombustible ronda el 98%, aunque es necesario aclarar su elevado costo y la imposibilidad de entrar en contacto con el agua (Schuchardt et al, 1998, pp. 200-202). Por esta razón, es necesario tomar en consideración otros catalizadores económicamente más asequibles, tales como los hidróxidos (i.e.,  $\text{NaOH}$  y  $\text{KOH}$ ), que pueden llegar a los mismos niveles de conversión de aceites a biodiesel que los alcóxidos. La observación más seria que tiene el uso de los catalizadores hidróxidos es que, en una mezcla con los aceites en un medio carente de agua, todavía se producen cantidades considerables de agua por la reacción entre el hidróxido y el alcohol, produciéndose una saponificación cuyo producto son espumas indeseadas y una reducción en el rendimiento de metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs por sus siglas en inglés). Para eliminar estas espumas además

del glicerol, producto de la transesterificación, son necesarias operaciones adicionales, como la separación del catalizador del biodiesel, y la eliminación de las aguas residuales, procesos costosos además de contaminantes (Schuchardt et al, 1998, pp. 200-202).

Como última anotación, en los últimos años, se han estado desarrollando nuevas tecnologías más baratas y efectivas para la producción de biodiesel utilizando catálisis básica. La transesterificación in situ mediada por una base es una de ellas. Este proceso busca un atajo entre el tedioso refinamiento y extracción de los aceites vegetales a partir de sus fuentes (i.e., semillas) y la transesterificación per se, (que según resultados obtenidos por Haas, Scott, Marmer y Foglia, 2004, pp. 83-84, muestran una eficiencia del 80%). En otras palabras, busca que la transesterificación ocurra dentro de la misma fuente vegetal, acortando de forma increíble el tiempo de obtención de FAMES y por supuesto, los costos que suponen el refinamiento de los aceites vegetales, que representan más del 70% del costo total de producción de biodiesel (Haas et al, 2004, p. 83).

#### **2.1.1.2.2 Proceso catalizado por un ácido**

Este proceso es el segundo más utilizado, y utiliza como catalizadores, al ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y sulfónico ( $H-S(=O)_2-OH$ ), por mencionar un par de ejemplos notables. Aunque produce niveles altos de metil ésteres, su uso es contraproducente al ser demasiado el tiempo que se necesita para obtener biodiesel (Khalid y Khalid, 2011). Además, para propiciar la conversión, son necesarias temperaturas elevadísimas (alrededor de  $100^\circ C$ ), no obstante, cabe señalar que existe una dependencia entre el tipo de alcohol utilizado en la reacción, y la proporción entre alcohol/aceite para no solamente propiciar que el equilibrio se incline hacia la formación de productos (biodiesel), sino también para reducir el tiempo que toma para alcanzar la conversión total, que en algunos casos, puede llegar a ser de 50 horas (Schuchardt et al, 1998, p. 200).

### 2.1.1.3 Método enzimático de producción de biodiesel

Resulta evidente que los métodos químicos de producción de biodiesel pueden resultar contraproducentes económica y ecológicamente hablando. Es por ello que se tomaron en consideración catalizadores biológicos, especialmente las lipasas. Estas son enzimas muy comunes en los microorganismos, que se encargan de hidrolizar triacilglicéridos (TAGs), liberando de esta forma compuestos derivados como diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG), los ácidos grasos libres (FFA), y el glicerol, reacción que puede apreciarse en la ecuación 3 (Macrae y Hammond, 1985, pp. 193-194). Las lipasas además, se encargan de catalizar procesos de interés industrial, como la transesterificación. Cabe señalar que, a diferencia de otras familias de enzimas, como las esterasas, las lipasas actúan de forma más óptima en sustratos insolubles, como triglicéridos de cadenas largas de ácidos grasos (i.e., más de 10 carbonos) (Dias Ribeiro, Machado de Castro, Zarur y Guimaraes, 2011, pp. 4-5).



Las lipasas reaccionan en un sistema que consta de dos fases: una fase acuosa que contiene la enzima disuelta, y una fase con el sustrato disuelto. Las lipasas tienen su sitio activo cubierto por una cubierta peptídica anfipática, la cual evita que el sustrato se una al sitio activo cuando no existe una interfase. Por el contrario, cuando la enzima se encuentra en la interfase del sistema, la cubierta peptídica sufre cambios conformacionales que permiten que el sustrato pueda unirse al sitio activo de la enzima y así puede llevarse a cabo la reacción de transesterificación (Luković, Knežević-Jugović y Bezbradica, 2014, pp. 48).

Entre las propiedades de las lipasas que tienen aplicación industrial, se puede destacar: a) su estabilidad en presencia de solventes orgánicos, b) su

capacidad para actuar en ausencia de cofactores (Dias Ribeiro et al, 2011, pp. 7-10), c) su alta selectividad, y d) amplia especificidad respecto a sustratos (Thakur, 2012, pp. 8-10). De las propiedades anteriores es importante señalar que la estabilidad enzimática varía según la procedencia de la lipasa. Por ejemplo, las lipasas pancreáticas y extracelulares, pierden su actividad a temperaturas de 40°C (Macrae y Hammond, 1985, p. 196), pero en general, las lipasas provenientes de una gran variedad de microorganismos, mantienen un nivel adecuado de actividad en el rango de 30°C a 60°C.

**Tabla 1:** Microorganismos a partir de los cuales se extraen lipasas de interés industrial.

<b>Microorganismo</b>	<b>Aceite</b>	<b>Aceptor acilo</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Candida antartica	Aceite de palma	Metanol	79%
Candida antártica	Aceite de semilla de algodón	Metanol	97%
Rhizomucor miehei	Aceite de semilla de soya	Metanol	68%-95%
Thermomyces lanuginosa	Aceite de girasol	Metanol	90%-97%
Penicillium expansum	Aceite residual	Metanol	92%
Bacillus subtilis	Aceite residual	Metanol	90%
Burkholderia cepacia	Aceite de soya	Metanol	80%

Adaptado de Luković, 2014, p. 50.

a. Se muestran las fuentes de triacilglicéridos (sustrato) comúnmente utilizadas, y el rendimiento esperado de FAMEs (porcentaje de conversión) una vez que el sustrato ha reaccionado con la lipasa respectiva

Además de la temperatura, la actividad enzimática de las lipasas depende de factores como el tipo de solvente orgánico utilizado, ratio alcohol-aceite, y si la enzima ha sido o no inmovilizada (Ghaly et al, 2010, pp. 54-55). Estos factores serán tratados posteriormente en este trabajo.

Para la producción de biodiesel, se utiliza una gama de lipasas, entre ellas la lipasa pancreática porcina. Algunos estudios demuestran que bajo condiciones bien establecidas, la lipasa pancreática puede llegar a catalizar la conversión de aceite de semilla de algodón a biodiesel en un 75% a 80% (Chattopadhyay, Karemore, Das, Deysarkar y Sen, 2010, p. 1251), aunque varias otras experimentaciones sostienen una conversión máxima de hasta 55% utilizando la enzima mencionada (Mendes, Oliveira y de Castro, 2012, pp. 128-131). La lipasa pancreática porcina es una enzima de costo muy económico, debido a su incipiente proceso previo de purificación, lo que repercute lamentablemente en su estabilidad y actividad enzimática.

Los investigadores han centrado su atención en la obtención de enzimas provenientes de microorganismos, y es que existen un sinnúmero de ventajas con esta aproximación, pues utilizando microorganismos (desde bacterias hasta hongos), se pueden obtener masivas cantidades de enzimas, además de ser mucho más sencilla la manipulación de su genoma para obtener lipasas con las características que se deseen. Destaca también la facilidad y rapidez con la que se pueden cultivar colonias de microorganismos en medios de cultivo baratos (Luković et al, 2014, pp. 49-52). En la tabla 1 se resumen algunos de los microorganismos más utilizados como productores de lipasas destinadas a la producción de biodiesel, así como la fuente de materia orgánica y el porcentaje de conversión total alcanzada por sus respectivas lipasas.

## **2.2 Inmovilización enzimática**

En la actualidad, el uso de las lipasas en la industria, especialmente para la producción de biocombustibles, se encuentra todavía limitada, debido a los métodos biotecnológicos de producción excesivamente costosos. De ahí la

importancia de encontrar una forma en la que las enzimas puedan conservarse y reutilizarse tras varios ciclos de producción (Illanes y Altamirano, 2008, pp. 155-156). La solución a este inconveniente consiste en la inmovilización de los biocatalizadores. Se entiende por inmovilización a la unión de una enzima con un soporte sólido, o al confinamiento de la enzima en un espacio determinado (Ghaly et al, 2010, pp. 61-63). Los orígenes de la técnica de inmovilización enzimática datan del año 1916, donde se utilizó invertasa inmovilizada en una matriz de carbón vegetal para hidrolizar sacarosa (Nisha et al, 2012, pp. 148-155). Desde entonces, y a partir de 1950, se centraron esfuerzos para desarrollar numerosos métodos de inmovilización. Por otro lado, como se aprecia en la tabla 2, existe poco consenso sobre los beneficios de utilizar enzimas inmovilizadas con respecto a las enzimas utilizadas en forma soluble, pues se ha observado casos en los que enzimas solubles han demostrado una mayor actividad que las inmovilizadas, y viceversa (Tischer y Wedekind, 1999, pp. 96-99). Para este respecto, es importante tomar en cuenta las propiedades intrínsecas de las enzimas, las interacciones físico-químicas entre enzimas y la matriz polimérica, y la naturaleza de los procesos a los que estos se encuentren sometidos.

**Tabla 2:** Cuadro comparativo entre enzimas libres y enzimas inmovilizados.

<b>Características</b>	<b>Enzima libre</b>	<b>Enzima inmovilizado</b>
Precio	Alto	Bajo
Eficiencia	Baja	Alta
Actividad	Inestable	Estable
Reutilización/recuperación	No es posible	Posible
Tolerancia a T, pH	Baja	Alta
Separación de sustrato	Difícil	Fácil
Separación de producto	Difícil	Fácil

Adaptado de Yücel, 2013, p. 212

No obstante, las ventajas respecto a costos (reutilización), separación de la enzima del producto, estabilidad y productividad, hacen de la inmovilización enzimática la metodología más razonable, especialmente para la producción de biodiesel (Tischer y Wedekind, 1999, pp. 96-99).

La metodología de inmovilización utilizada en este estudio fue por medio de enlace covalente. Se logra mediante la unión directa del soporte a la enzima (Nisha et al, 2012, pp. 148-155). Un enlace covalente se forma cuando existe interacción entre los residuos aminoacídicos de la enzima y ciertos grupos funcionales del soporte/ matriz (p. ej.,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ) (Illanes y Altamirano, 2008, p. 157). Generalmente, este método representa una alternativa al momento de inmovilizar moléculas de gran tamaño, donde otros métodos de inmovilización, como el atrapamiento, resultan inefectivos, debido a que el polímero del soporte o matriz cubren el sitio activo de la enzima, privándola de su capacidad catalítica (Pal y Khanum, 2012, pp. 409-410). Los soportes que se utilizan para esta metodología son variados, entre ellos cabe destacar a los polímeros de naturaleza inorgánica, natural (p. ej., quitosano) y sintéticos (p. ej., fibras de nylon) (Yücel, Terzioğlu y Özçimen, 2013, pp. 211-218).

Dentro de los polímeros de origen orgánico más utilizados está el quitosano. Un polisacárido obtenido a partir de la hidrólisis de la quitina presente en los caparazones y exoesqueletos de invertebrados como crustáceos, de modo que es un material fácil de obtener. Se considera como un excelente material de soporte para las enzimas inmovilizadas gracias a su biodegradabilidad, inocuidad y alta afinidad a la estructura proteica debido a su carácter hidrofílico (Dong et al, 2011, pp. 395-397). En adición, existen varios métodos para la activación de la matriz/ cápsulas de quitosano, donde se usan reactantes como el glutaraldehído (Illanes y Altamirano, 2008), cuya función es optimizar las características mecánicas de las enzimas, que en su ausencia serían muy limitadas (Tischer y Wedekind, 1999, pp. 100-108).

## **2.3 Factores físico-químicos a considerar en el método enzimático de producción**

La elección del tipo de catalizador es un factor importante a tomar en consideración en el proceso de transesterificación, no obstante, existen factores adicionales que hay que tener muy en cuenta para lograr un nivel de conversión cercano al 100%. A continuación se exploran algunos de estos factores:

### **2.3.1 Selección de alcohol y proporción molar aceite: alcohol**

Son varios los reactivos que han sido propuestos para ser utilizados como aceptores acilo en el proceso de transesterificación. Entre los más utilizados, y baratos, se encuentran los alcoholes de cadena corta, como el metanol y el etanol. Sin embargo, el uso de estos alcoholes propicia a la inactivación de la enzima, inclusive cuando esta se encuentra inmovilizada (Ghaly et al, 2010, pp. 64-66). Esto se da generalmente por la baja solubilidad que posee el metanol y el etanol en los aceites, de modo que se propicia la formación de una fase líquida que compite por el sitio activo de la enzima con el sustrato y por consiguiente, se produce una inactivación, lo que inevitablemente reduce el rendimiento de FAMES (Royon, Daz, Ellenrieder y Locatelli, 2006, pp. 648-653).

Para resolver este problema, primeramente hay que tener en mente que la proporción estequiométrica sugerida para que se lleve a cabo la transesterificación es de tres moles de alcohol por cada mol de TAG (triacilglicerido) para que se produzca la formación de tres moles de metil ésteres de ácidos grasos y una mol de glicerol (Meher et al, 2004, p. 256). En segundo lugar, es prudente considerar la proporción molar alcohol: aceite, pues se ha demostrado que mientras mayor es la proporción molar de alcohol con respecto al aceite, mayor es la solubilidad en el sistema, debido a que esto da lugar a la separación del glicerol. Los mejores resultados señalan proporciones de 3:1, 4:1, 6:1 hasta 9:1, sin embargo, una proporción excesiva (p. ej., 15:1) puede resultar contraproducente debido a que no se produce una separación evidente del glicerol, produciendo inactivación de las enzimas (Meher et al,

2004, p. 256). Cabe resaltar que la inactivación enzimática por acción de los alcoholes, se da en una proporción alcohol: aceite tan reducido como 1.5:1, de modo que la inactivación ocurriría inevitablemente con las proporciones propuestas arriba, y paradójicamente, es necesario un exceso de alcohol para que la reacción proceda hacia la formación de FAMEs. La solución a este problema recae en la adición dosificada o “alcoholisis (p. ej., metanólisis) paso a paso” evitando así la inactivación, y por el contrario, permitiendo alcanzar niveles de conversión superiores al 95% (Ranganathan, Narasimhan, Muthukumar, 2007, pp. 3977-3978) La metanólisis paso a paso consiste generalmente en la división en tres volúmenes iguales de la cantidad original de alcohol a utilizar, los cuales serán adicionados después de tiempos prudenciales al sistema para que pueda llevarse a cabo la transesterificación de manera adecuada. Otra opción es el uso de metil acetato, que evita la inactivación por alcoholes de cadena corta, permitiendo niveles de conversión de hasta 92% utilizando Novozym 435. La desventaja del uso de metil acetato, no obstante, es su elevado costo (Tan, Lu, Nie, Deng y Wang, 2010, pp. 628-634)

### **2.3.2 Selección de solventes orgánicos**

Uno de los principales obstáculos en la transesterificación enzimática es la frecuente inhibición enzimática por los alcoholes de cadena corta y el glicerol. Para contrarrestar este problema, se han desarrollado protocolos en los que se involucra la acción de solventes orgánicos, puesto que permiten la miscibilidad de los sustratos y otras especies reactivas, de modo que se optimice la conversión de aceites a FAMEs. Los solventes menos adecuados son los solventes polares, como el acetonitrilo y la acetona, en el caso del último, su uso apenas logra un porcentaje de conversión del 40% (Nie, Xie, Wang y Tan, 2006, pp. 142-147). Por otra parte, los solventes no polares, como el hexano, tolueno y el t-butanol, son idóneos para biocatálisis.

Para clasificar los distintos solventes de acuerdo a su polaridad, existe el valor  $\log P$ , el cual es inversamente proporcional a la polaridad del solvente

(Chattopadhyay et al, 2010, p. 1254). Y se tiene como consenso que un solvente cuyo valor de log P se encuentre por debajo de 2, no es recomendable para la biocatálisis (Nie et al, 2006, pp. 142-147). En los últimos años, no obstante, el uso de solventes como el t-butanol, ha ido consolidándose debido a su espectacular capacidad de disolver las fases inhibitorias de metanol y de glicerol en el sistema, además de no competir de forma alguna por el sitio activo de la enzima, y por su toxicidad nula. A pesar de sus magníficos beneficios, el uso de este y todos los solventes orgánicos, requiere, al igual que en los métodos de producción química de biodiesel, una etapa de extracción y recuperación de los mismos, si bien en el caso del t-butanol, se puede lograr de forma más sencilla que con otros solventes (Royon et al, 2006, pp. 648-653).

### **2.3.3 Actividad y contenido de agua en la reacción**

La cantidad de agua en el proceso de transesterificación enzimática es de gran importancia. Se conoce que para que las enzimas funcionen de manera adecuada y conserven muchas de sus propiedades (p. ej., actividad y estabilidad), es necesaria una cantidad determinada de agua (Kumari et al, 2009, pp. 3-5; Ghaly et al, 2010, pp. 66-67). También es conocido el hecho de que la actividad de las enzimas puede ser afectada por el agua que se encuentre en sus alrededores, permitiendo un incremento en el área de interfase (aceite-agua), que es donde se da lugar el proceso de transesterificación. Como se afirmó al principio del párrafo, la cantidad de agua y el efecto que puede tener en la transesterificación enzimática es relativa. Por ejemplo, muchas enzimas necesitan obligadamente pequeñas concentraciones de agua para funcionar correctamente. Por ejemplo, en el caso de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, el rendimiento de FAMEs se elevó a casi 98% cuando el agua se encontraba en un porcentaje de 5%, mientras que en su ausencia, el rendimiento decreció un 28% (Atadashi, Aroua, Abdul y Sulaiman, 2012, p. 3457).

Por otra parte, existen lipasas que no muestran un desempeño óptimo cuando se encuentran en presencia de concentraciones de agua mayores al 4%, como

es el caso de las lipasas de *Candida antarctica* y de *Rhizopus oryzae*. Esto sucede por una sobresaturación de agua en las porosidades de las enzimas, evitando la superficie disponible para interactuar con los sustratos. Todo esto da cuenta de que la cantidad de agua en el sistema es un factor dependiente de varios otros, como el tipo de materia prima a utilizar, la proveniencia de la enzima, su estructura, e inclusive de la presencia de alcohol, o de solventes orgánicos (Ghaly et al, 2010, pp. 66-68; Atadashi et al, 2012, p. 3460).

### **2.3.4 Temperatura de reacción**

La actividad enzimática depende considerablemente de la temperatura del sistema. Por ejemplo, cuando sube la temperatura, se incrementa la velocidad de reacción de las enzimas, debido al incremento de energía cinética de las moléculas que reaccionan, no obstante un exceso de energía calorífica puede suponer la desnaturalización de la estructura proteica de la enzima, lo que supone una pérdida de la actividad catalítica (Murray, Granner y Rodwell, 2007, pp. 70-71).

Dependiendo del tipo de enzima y de su proveniencia, la temperatura requerida para su óptimo funcionamiento puede ser muy variable, y se ha observado que es necesario incrementarla cuando se trabaja con enzimas inmovilizadas. Por ejemplo, las enzimas de *Pseudomonas fluorescens*, tienen una actividad óptima a temperaturas de 50-70°C, mientras que la enzima Novozym<sup>®</sup> 435, permite una mayor conversión de sustrato a producto cuando la temperatura es de 60°C, independientemente del tiempo de reacción (Fjerbaek et al, 2009, p. 1303).

Las enzimas pueden inactivarse pasando cierto umbral respecto a la temperatura, el cual generalmente se encuentra por encima de los 60°C. Sin embargo, aunque existan enzimas que pueden realizar catálisis a tales temperaturas, es prudente considerar si estas serán reutilizadas extensivamente, pues en este caso, la temperatura juega un papel muy importante en el tiempo de vida útil de las enzimas. Según estudios realizados,

la lipasa inmovilizada Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, logró la mejor conversión de aceites a biodiesel a una temperatura de 50°C (Dias Ribeiro et al, 2011, pp. 10-11).

## **2.4 Modelos cinéticos**

El uso de modelos matemáticos para estudiar y predecir el comportamiento de reacciones bioquímicas es una herramienta poderosa y económica, especialmente si se los aplica a la optimización de procesos biotecnológicos. La modelación se vale de ecuaciones diferenciales que describen de manera simplificada, cómo opera un fenómeno determinado. En los estudios orientados a la producción de biodiesel por vía enzimática, lo que se busca es desarrollar modelos cinéticos que permitan determinar las concentraciones óptimas de materia prima y de alcohol necesarias para obtener los mayores rendimientos posibles, así como evaluar los efectos adversos que las especies reactantes tienen en la integridad y actividad enzimática. Esto se logra mediante la determinación experimental de parámetros determinados que son considerados en el modelo, la introducción de esos valores al modelo, y la simulación de estos modelos bajo diversas condiciones (Bailey, 1998, pp. 8-20).

Muchos modelos cinéticos buscan determinar cómo los efectos de la concentración (y cambios en esta) de las especies reactivas como el sustrato y el alcohol, afectan, bajo diferentes condiciones, la velocidad de producción inicial. Cabe señalar que es complicado cuantificar las constantes cinéticas cuando se trata con una reacción compleja, debido a que muchos reactantes interactúan entre sí, o se encuentran en fases de transición o inhibiendo a la enzima. Por tal razón, se busca desarrollar modelos optimizados en los que se descarte la acción de reactantes cuyo efecto sea despreciable, así como el evitar considerar las reacciones de reversibilidad que pueden darse en el proceso (Fedosov et al, 2013, pp. 156-157).

La mayoría de los modelos cinéticos se centran en la esterificación de ácidos grasos, un proceso diferente al de transesterificación de ácidos grasos. Pocos estudios se han centrado en desarrollar modelos cinéticos para comprender el

comportamiento de la reacción en la transesterificación mediada por enzimas inmovilizadas (Al-Zuhair et al, 2007, pp. 951-952). A continuación se hace mención de algunos de estos estudios:

Un estudio llevado a cabo por Al-Zuhair et al, 2007, pp. 951-959, se centró en desarrollar un modelo cinético basado en el mecanismo de reacción Ping-Pong Bi Bi en el que describe la transesterificación de ácidos grasos utilizando enzima soluble de *Mucor miehei*, e incluyó los efectos inhibitorios que presentan las concentraciones de sustrato y de metanol en el comportamiento de la reacción (ecuación 2.3; donde  $v$  representa la velocidad de reacción,  $V_{max}$  es la velocidad máxima de reacción,  $K_s$  y  $K_a$ , constantes de disociación para sustrato  $[S]$  y alcohol  $[A]$ ;  $K_{is}$  y  $K_{ia}$ , constantes de inhibición para  $[S]$  y  $[A]$ ). Este estudio demostró que utilizando aceite de palma como sustrato, y metanol como aceptor acilo, la inhibición enzimática se produce cuando existe una proporción aceite: alcohol superior a 4:1. Concluyendo que la transesterificación es más sensible a cambios en la concentración de sustrato que en la concentración de metanol. Los mismos autores, utilizaron el mismo modelo cinético (ecuación 4) para desarrollar un segundo ensayo en el que compararon la efectividad de las lipasas inmovilizadas, comparadas con las solubles en la producción de biodiesel a partir de aceites de desecho, considerando la transferencia de masa del sustrato y del alcohol, así como los efectos de inhibición de ambos reactantes (Al-Zuhair et al, 2009, pp. 256-261).

$$v = \frac{V_{max}}{1 + (K_{ia} / [A])[1 + ([S] / K_s)] + (K_{is} / [S])[1 + ([A] / K_a)]} \quad (\text{Ecuación 4})$$

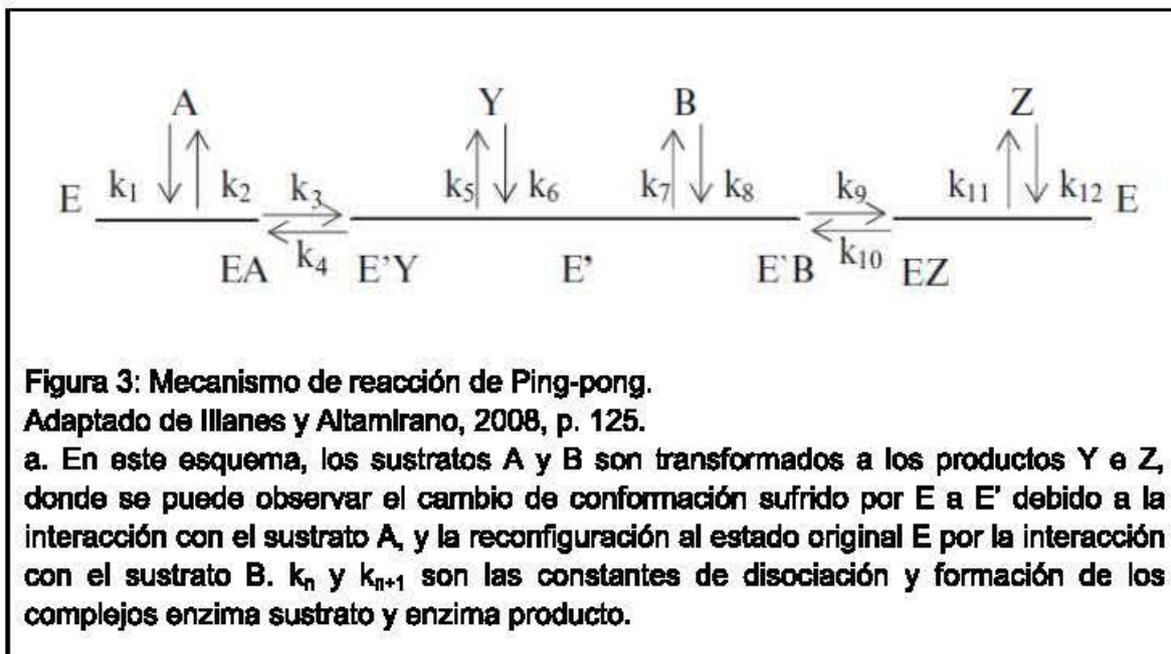
Otro estudio que considera enzimas inmovilizadas en la producción de biodiesel es el de Fedosov et al, 2013, pp. 156-158, donde se procuró el diseño de un modelo cinético para la producción de biodiesel utilizando enzima inmovilizada Novozym 435 (ecuación 5; donde  $k_{s1}$ ,  $k_{s2}$  y  $k_{p1}$ ,  $k_{p2}$  son coeficientes que refieren a la reversibilidad de la reacción, s: sustrato, p:

producto). En este modelo, se consideró reversibilidad de todos los pasos de reacción, y para simplificar la construcción y análisis del modelo, el esquema de reacción se dividió en bloques, para después combinarlos y predecir el comportamiento de estas enzimas bajo diversas condiciones. De este estudio se desprendió que la enzima Novozym 435 es eficiente para producir biodiesel a partir de aceites de baja calidad.

$$\frac{v}{e_0} = \frac{k_{s1} \cdot s_1 \cdot k_{s2} \cdot s_2 - k_{p1} \cdot p_1 \cdot k_{p2} \cdot p_2}{k_{s1} \cdot s_1 + k_{s2} \cdot s_2 + k_{p1} \cdot p_1 + k_{p2} \cdot p_2} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En la producción de biodiesel por vía enzimática, el producto secundario más común es el glicerol, y se ha comprobado que la presencia de esta sustancia en el sistema disminuye la velocidad y el rendimiento de la reacción. Es por ello que al momento de construir un modelo cinético, es necesario considerar los efectos del glicerol. Hong et al, 2011, pp. 1908-1911, proponen un modelo basado en el desarrollado por Al-Zuhair et al, (2007, p. 956) (ecuación 4), donde, además de considerarse la inhibición por metanol, se considera el efecto del glicerol, demostrando que es posible desarrollar y diseñar procesos para producir biodiesel en los que pueden eliminarse la inhibición por metanol y la inactivación por glicerol y obtenerse rendimientos de hasta 94.6%.

## 2.5 Mecanismos de reacción enzimáticos

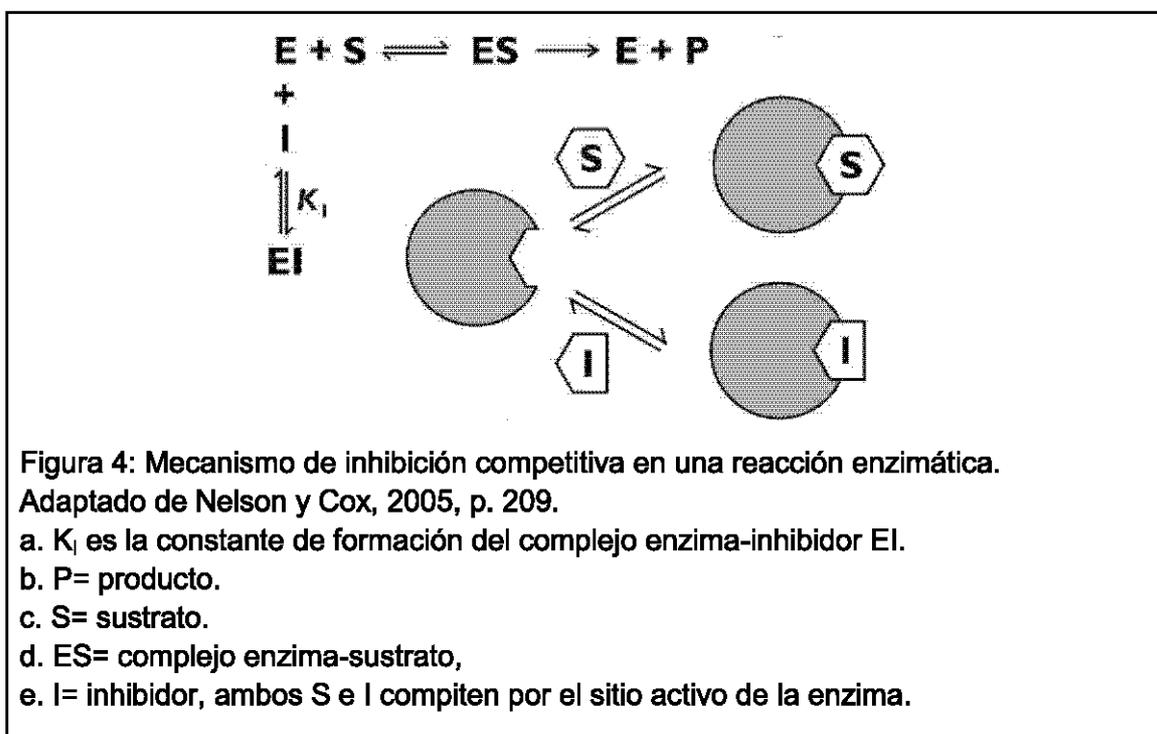


La mayoría de los procesos enzimáticos de aplicación industrial, presentan reacciones que involucran varios sustratos, las cuales pueden valerse de dos mecanismos principales de reacción, denominados secuenciales y de ping-pong (figura 3). El mecanismo de ping-pong es el más común en la producción de biodiesel. En este mecanismo, ocurre un cambio estructural de la enzima por la interacción con un sustrato A, para después volver a su conformación original después de la interacción con el sustrato B (Taylor, 2002, pp. 59-60). Es decir, la enzima libera uno o más productos antes de que todos los sustratos sean agregados (Murray et al, 2007, p. 76). El mecanismo de ping-pong tiene especial relevancia en este trabajo, debido a que es el mecanismo de reacción que siguen las lipasas en la transesterificación de ácidos grasos (Illanes y Altamirano, 2008, p. 130).

### 2.5.1 Inhibición enzimática

Las enzimas pueden resultar privadas de su capacidad catalítica cuando se encuentran en presencia de determinadas moléculas de carácter orgánico o inorgánico, las cuales pueden unirse de forma covalente o no covalente a sus

sitios activos. La inhibición entre estos compuestos de bajo peso molecular y las enzimas pueden ser de dos tipos, irreversibles y reversibles (Sharma, 2012, p. 5).



El tipo de inhibición observado en la producción de biodiesel vía enzimática, es la inhibición reversible, la cual causa un decremento en la velocidad de reacción enzimática, pero debido a la naturaleza no covalente de la interacción inhibidor-enzima, esta última puede recobrar su actividad. Existen varios tipos de inhibición enzimática reversible, p. ej., competitiva, no competitiva y acompetitiva. El tipo de inhibición más común en las reacciones de transesterificación es la competitiva (figura 4), en donde el inhibidor resulta tener una complementariedad estructural con el sitio activo de la enzima, y por consiguiente muy similar a la del sustrato, de modo que la competición se da con el sustrato por ocupar el sitio activo de la enzima, lo que se conoce como una unión mutuamente exclusiva (Sharma, 2012, p. 5).

En la producción de biodiesel, las lipasas son propensas a la inhibición competitiva por alcohol, debido a la cantidad excesiva que se utiliza para suplir los efectos de reacción reversa (Magalhaes, Falcao, Nogueira y Pessoa, 2010,

pp. 37-38), y a la inactivación por glicerol. El glicerol reduce la actividad enzimática debido a la limitación de transferencia de masa que se produce en las enzimas inmovilizadas, lo que promueve la acumulación de glicerol en la mezcla, retardando la velocidad de reacción durante la producción de biodiesel y reduciendo el grado de conversión (Hong et al, 2011, pp. 1908-1910).

## **2.6 Reactores enzimáticos**

Los reactores son depósitos en los cuales ocurren reacciones químicas de utilidad industrial. Son la base fundamental para la producción industrial de cualquier producto biotecnológico, desde anticuerpos monoclonales hasta biocombustibles, por tal razón, el diseño y construcción de estos instrumentos es de vital importancia y creciente complejidad, pues requiere tener en consideración factores de carácter ingenieril, científicos y económicos. Por ejemplo, los factores más comunes que se consideran cuando se va a diseñar un reactor son: su tamaño, su configuración (p. ej., si tiene agitación o no), condiciones físicas y químicas (p. ej., pH, temperatura, oxígeno disuelto) a controlar dentro del sistema, y por supuesto el modo de operación (p. ej., en modo continuo, discontinuo, alimentado; una o varias etapas). Los factores que se consideran para el diseño de un reactor, tienen una profunda repercusión en el desempeño del mismo al momento de la etapa de operación (Doran, 1995, p. 333).

Además de las consideraciones mencionadas, al momento de diseñar un reactor, se debe entender el objetivo principal del proceso, para así poder responder a la incógnita de si este será capaz de producir la cantidad deseada de producto (rendimiento), y si este proceso puede llevarse a cabo a un costo razonable. Se encuentra implícito en estas consideraciones los costos operacionales que supone la obtención del producto determinado. En la industria de los biocombustibles, un asunto que no puede ser pasado por alto es la inactivación enzimática, especialmente cuando en la etapa del diseño de una configuración, y un modo de operación de reactor específico. Esto tiene dependencia total con el tiempo de vida útil (capacidad de reutilización) de las

enzimas, debido al elevado costo de producción de estas y de los transportadores (carriers). Se han propuesto una variedad de soluciones a este inconveniente, en base a estudios que discuten, por ejemplo, si el modo de operación y configuración de un reactor es ideal para llevar a cabo un proceso con enzimas inmovilizadas o en estado libre; si existen repercusiones en la transferencia de masa; o si el uso de solventes es adecuado o no en tales circunstancias (Murty, Bhat y Muniswaran, 2002, pp. 57-61).

Entre los reactores más utilizados para fines biotecnológicos está el reactor de tanque agitado por lote discontinuo, el reactor continuo de tanque agitado y el reactor de flujo pistón de lecho empacado (Fjerbaek et al, 2009, pp. 1308-1309).

### **2.6.1 Reactor de tanque agitado por lote discontinuo (batch)**

Este es el tipo de reactor más utilizado en la industria debido a su versatilidad y facilidad de operación (Murty et al, 2002, pp. 64-65). El reactor por lote discontinuo, también conocido como batch, consiste primordialmente de un agitador y de un sistema integrado para enfriar o calentar el sistema. Generalmente son fabricados en vidrio, pero también son comunes en acero inoxidable. El reactor batch es visto como un reactor ideal, porque no existen entradas ni salidas del sistema (Doran, 1995, p. 336). Generalmente, se asume que en este tipo de reactores existe una mezcla perfecta, lo que quiere decir que tanto las concentraciones de reactivos son uniformes, así como la ausencia de gradientes de temperatura y de pH. Esta asunción permite que el análisis sea mucho más sencillo pues se despreja la localidad de los contenidos del reactor (Liu, 2013, pp. 141-147).

El diseño de un reactor batch empieza por realizar un balance de moles de un reactivo cualquiera A:

$$\text{Entradas} - \text{Salidas} + \text{Generación} - \text{Consumo} = \text{Acumulación} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Debido a que en el modo de operación discontinuo, no existe flujo de entrada ni de salida, si entendemos que el reactivo A se está consumiendo, tampoco existe generación alguna, de modo que la ecuación 6 queda de la siguiente forma:

$$- \text{Consumo} = \text{Acumulación} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Entonces el balance de moles del reactante A es:

$$r_A V = - \frac{dn_A}{dt} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Debido a que en la configuración batch el volumen es constante, la ecuación 8 puede reescribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dC_A}{dt} = -r_A \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde  $r_A$  es una expresión de la velocidad de reacción y  $dC_A/dt$  denota el cambio de concentración del reactivo A en el tiempo. Cabe señalar que la ecuación 9 sólo es útil cuando se consideran reactores batch con densidad y volumen constantes (Liu, 2013, pp. 141-147).

Debido a que no existe entrada ni salida del fluido, se el tiempo que el sustrato S permanece dentro del reactor se denomina tiempo de reacción  $t$  y se obtiene

utilizando la ecuación 9, la cual puede relacionarse con la ecuación de cinética Michaeliana:

$$-\frac{dS}{dt} = r = \frac{V_{\max} \cdot S}{K + S} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Integrando la ecuación 10, se obtiene el tiempo de reacción (ecuación 11):

$$t = \frac{K \ln\left(\frac{S_0}{S}\right) + (S_0 - S)}{V_{\max}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

A pesar de ser un proceso flexible, el reactor de tanque agitado por lote discontinuo tiene varias desventajas, como la pérdida de productividad volumétrica en sistemas a gran escala, así como la destrucción de los transportadores por el estrés mecánico producido por los agitadores, lo que repercute en la actividad catalítica de las lipasas y en el costo total del proceso (Tufvesson et al, 2010, p. 6; Tan et al, 2010, p. 632). No obstante, hay registros de procesos batch que pueden alcanzar un grado de conversión de hasta 96% utilizando lipasa de *Candida sp.*, bajo condiciones óptimas de reacción (Nie et al, 2006, pp. 142-144). Otros experimentos han demostrado que utilizando aceptores ácido como el metil acetato, evita la inactivación de la lipasa Novozym 435 causada por alcoholes de cadena corta, y se alcanzó un 92% de conversión en un reactor batch, y no se detectó pérdida de actividad catalítica inclusive después de 100 corridas. Lamentablemente, el costo del metil acetato, la baja tasa de reacción y su costo, lo hacen poco atractivo para aplicarlo industrialmente (Tan et al, 2010, p. 631).

Shimada et al, 2002, pp. 133-141, demostró que producir biodiesel en un proceso batch de dos etapas, puede tener ventajas por sobre el uso de un reactor de flujo pistón, debido a que en este último, el glicerol se deposita y ocasiona problemas en la transferencia de masa, lo que reduce la eficiencia de reacción del proceso y promueve la presencia de alcohol (metanol) sin reaccionar, lo que a su vez, inhibe la actividad de la lipasa. Por otra parte, en un proceso batch de dos etapas, el glicerol no se acumula debido a la agitación, de modo que la cantidad de alcohol sin reaccionar es menor y se reduce la inhibición enzimática.

### **2.6.2 Reactor continuo de tanque agitado (CSTR)**

En el reactor de tanque agitado continuo, también llamado quimiostato (cuando se encuentra en estado estacionario), se asumen las mismas condiciones que en el reactor batch, es decir, que todo el contenido dentro del reactor se encuentra en estado de mezcla perfecta, y no existe gradiente de temperatura y pH. No obstante, la diferencia radica en que este modo de operación incluye entrada y salida de material (Liu, 2013, pp. 194-197).

Al igual que en el caso anterior, para poder calcular la velocidad de reacción o de cambio molar de una especie A en un reactor continuo de tanque agitado, se procede de la siguiente manera (Ecuación 6):

$$\textit{Entrada} - \textit{Salida} + \textit{Generación} - \textit{Consumo} = \textit{Acumulación}$$

En este caso, se toma en consideración las entradas y salidas de material en el balance de masa:

$$\textit{Entrada} - \textit{Salida} - \textit{Consumo} = \textit{Acumulación} \quad (\text{Ecuación 12})$$

La ecuación 12 puede reescribirse así:

$$FC_{A_0} - FC_A - r_A V = \frac{dC_A V}{dt} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Asumiendo al sistema en estado estacionario y despejando  $r_A$  se obtiene:

$$r_A = \frac{F}{V} (C_{A_0} - C_A) \quad (\text{Ecuación 14})$$

El tiempo de residencia para un CSTR es:

$$\tau = \frac{(C_{A_0} - C_A)}{r_A} \quad (\text{Ecuación 15})$$

La presencia de agitación en estos reactores es ventajosa, pues evita la formación de gradientes de concentración y temperatura. Una ventaja del CSTR por sobre los reactores de lecho empacado (PFR), es una menor caída de presión a altas velocidades de flujo. Sin embargo, para producir biodiesel en este tipo de reactores, su tamaño debe ser mayor que el de otros modos de operación, como los reactores de lecho empacado, para así poder lograr el mismo nivel de conversión (Murty et al, 2002, p. 64), además el uso de CSTR conlleva mayores tiempos de reacción, una mayor proporción molar de aceite/ alcohol, y mayores tiempos de residencia (Da Silva et al, 2013, p. 244). De modo que varios estudios (Jansri y Prateepchaikul, 2015, pp. 74-81; Kumar et

al, 2010, pp. 43-56; Leevijit, Wisutmethangoon, Pateepchaihul, Tongurai y Allen, 2006, pp. 336-346), se han enfocado en diseñar nuevas configuraciones en modo continuo (reactores en serie), con el fin de aumentar las velocidades de conversión, reducir el contenido de ácidos grasos libres (FFA) en la muestra, y reducir el costo de procesamiento. Sin embargo cabe señalar que estos estudios están orientados principalmente a la producción de biodiesel mediada por catalizadores básicos.

### 2.6.3 Reactor de flujo pistón de lecho empacado (PFR)

Los reactores de flujo pistón de lecho empacado generalmente son rellenos con enzimas inmovilizadas en una matriz. Este tipo de reactores consiste de un cilindro posicionado de manera vertical, el cual contiene el material biocatalítico empacado en su interior, de ahí su nombre (Doran, 1995, p. 340).

En este modo de operación, el flujo de entrada se dirige en un solo sentido, y no se observa retroalimentación. Se da un gradiente uniforme de concentración a medida que el flujo de materia pasa a lo largo del reactor, sin embargo, cabe mencionar que las concentraciones no varían con respecto al espacio (Liu, 2013, pp. 178-183).

El balance de moles para una especie A en un reactor de flujo pistón de lecho empacado, cuando pasa entre un diferencial de volumen ( $V$ ) y ( $V + dV$ ) es el siguiente:

$$F_{C_A|V} - F_{C_A|V+dV} - r_A dV = 0 \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$-dF_{C_A} - r_A dV = 0 \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$r_A = \frac{dF_{C_A}}{dV} \quad (\text{Ecuación 18})$$

El tiempo de residencia para un reactor flujo pistón de lecho empacado es:

$$\tau = -\int \frac{dC_A}{r_A} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Se mencionó que el tiempo de residencia es útil para poder calcular el volumen que tendrá el reactor. Y debido a que el objetivo del proceso es tener un nivel constante de material en el sistema, es muy útil el uso de un parámetro denominado velocidad de dilución D:

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{Ecuación 20})$$

La velocidad de dilución D se refiere a la velocidad a la cual los contenidos del reactor son continuamente reemplazados por la corriente entrante al sistema (Liu, 2013). Si se reemplaza la ecuación general del tiempo de residencia:

$$\tau = \frac{V}{F} \quad (\text{Ecuación 21})$$

En la ecuación 20, se obtiene:

$$D = \frac{1}{\tau} \quad \text{(Ecuación 22)}$$

Con la ecuación 22 es posible calcular el flujo de sustrato que ingresará al reactor.

Algunas de las ventajas al utilizar reactores de flujo pistón de lecho empacado, son: a) su mayor área de superficie para reacción por unidad de volumen que el resto de configuraciones; b) artefactos sencillos de construir, y c) de operar. Debido a la forma en que las enzimas son inmovilizadas y empacadas en este tipo de reactor, se previene el arrastre y pérdida de biocatalizador por el flujo (Liu, 2013, pp. 178-183).

Por el contrario, este tipo de reactor tiene ciertas desventajas. Por ejemplo, en la producción de biodiesel a gran escala en PFR, un fenómeno habitual es la caída de presión, que se relaciona íntimamente con la velocidad de flujo y el diámetro de partícula. Es decir, a medida que el diámetro de partícula incrementa, se reduce la caída de presión, pero a su vez, la transferencia interna de masa se reduce, lo cual baja la eficiencia de transformación del sistema, de modo que es necesario un punto intermedio para evitar problemas en el rendimiento. Según Fjerbaek et al, 2009, pp. 1308-1310, el diámetro de partícula y la velocidad de flujo adecuado para evitar la caída de presión, son de 4 mm y 0.01 m/s respectivamente. El exceso de glicerol en el sistema también afecta la transferencia interna de masa debido a que forma una película sobre las partículas, de modo que el flujo de sustrato no logra permear adecuadamente la matriz que contiene a las enzimas (Hama et al, 2011, p. 10419).

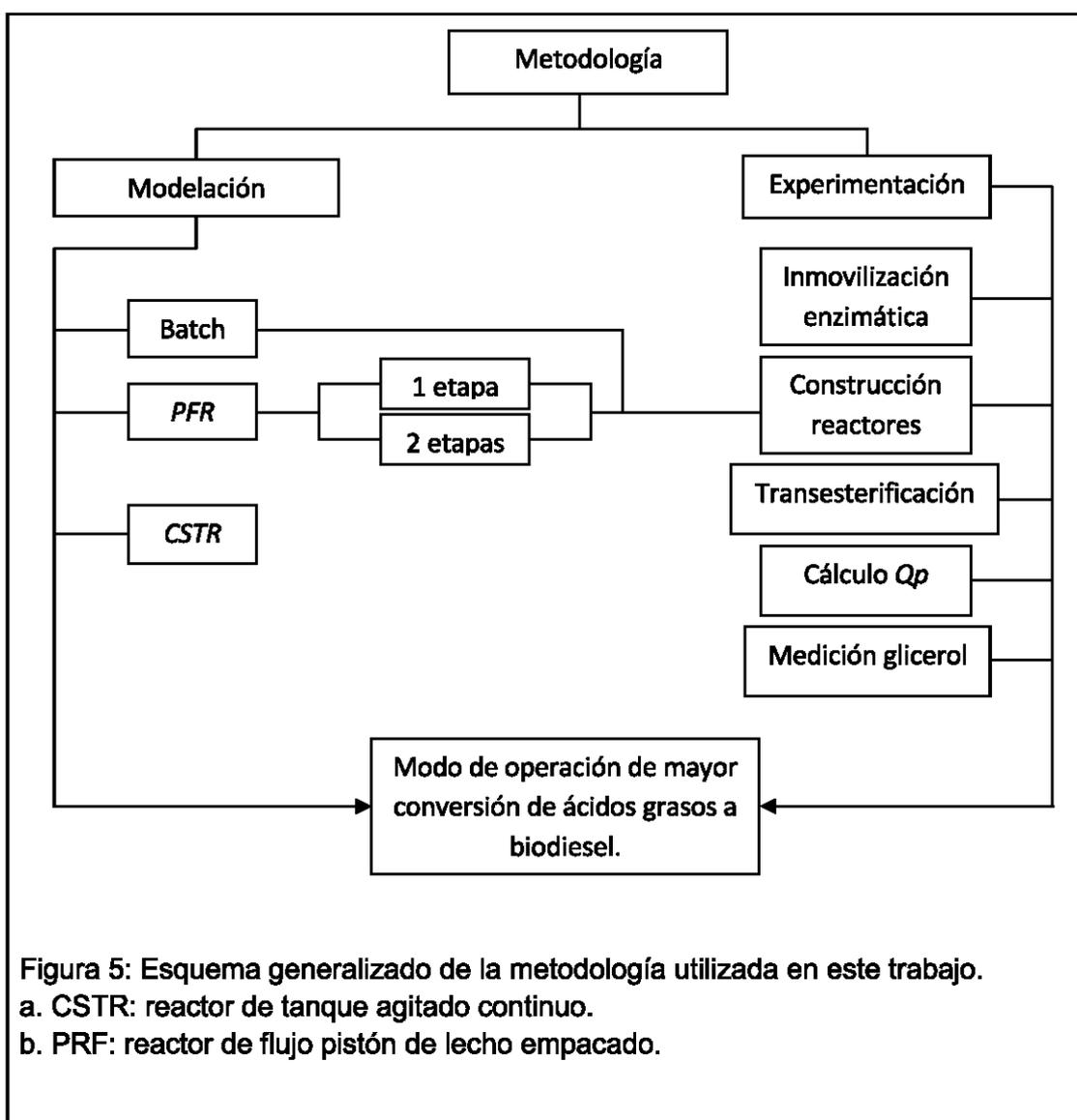
Para contrarrestar estos efectos nocivos, se puede optar por el uso de solventes orgánicos, pero el problema con su uso radica en el costo de producción debido a que estos necesitan ser extraídos del sistema, y generalmente suelen ser sustancias tóxicas. La solución parcial que proponen

varios autores es la eliminación simultánea de glicerol, para evitar una alta viscosidad en el sistema, una adición fraccionada de metanol (metanólisis paso a paso), además de considerar factores como la velocidad de flujo y la composición de la mezcla de reacción (Hama et al, 2011, pp. 10419-10424).

El rendimiento y la pureza del biodiesel en estos reactores son apreciables. Se han obtenido rendimientos superiores al 90% a partir de aceites de desecho, y las enzimas inmovilizadas han mantenido su actividad y estabilidad lo suficiente como para ser reutilizadas alrededor de 100 días, todo esto en un medio libre de solventes orgánicos (Fjerbaek et al, 2009, 1308-1311). Otro trabajo demuestra que utilizando reactores de lecho empacado en tres etapas con enzima inmovilizada de *Candida* sp., y metanólisis continua, se puede convertir hasta el 91 % de aceites de desecho doméstico en un biodiesel que es incluso superior en propiedades al biodiesel estándar de China, Alemania y Estados Unidos (Chen, Ying y Li, 2006, pp. 668-673).

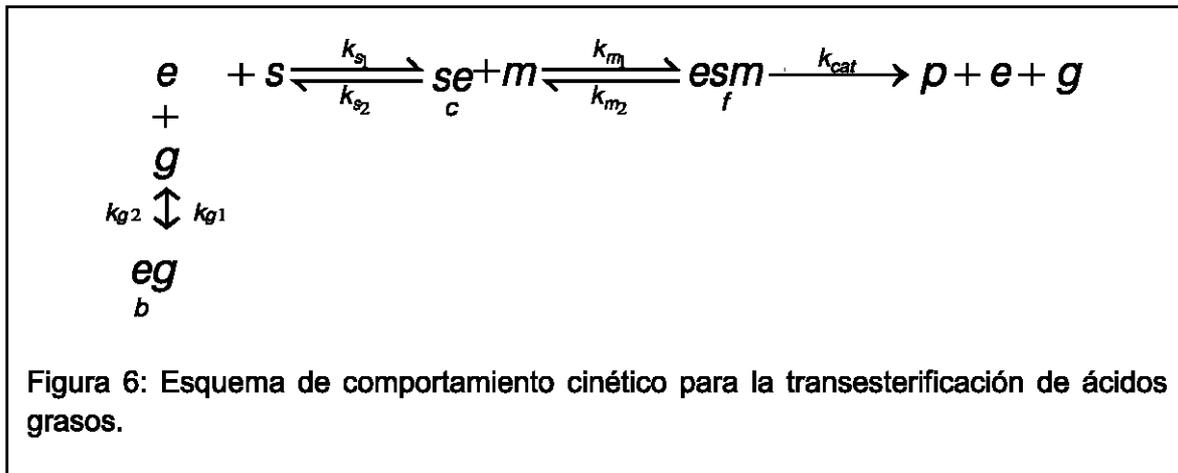
## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación (figura 5) se puede apreciar el esquema metodológico utilizado para encontrar el tipo de reactor más eficiente al momento de producir biodiesel por vía enzimática. A breves rasgos, el proyecto se dividió en dos etapas, la primera, consta de un estudio teórico en base al desarrollo de un modelo cinético que explica la transesterificación enzimática de ácidos grasos; y la segunda etapa, que se vale de los resultados obtenidos de las simulaciones teóricas para comprobar o refutar empíricamente tales resultados.



### 3.1 Etapa I: modelación

El modelo cinético desarrollado puede observarse en la figura 6:



Donde:

e= enzima libre (lipasa); s= sustrato (aceite de oliva); c (se)= complejo enzima-sustrato; m= especie de alcohol a utilizar (metanol); f (esm)= complejo enzima-sustrato-metanol; p= producto (FAMEs); b (eg)= complejo enzima-glicerol; g= glicerol;  $k_{s1}$ = constante de velocidad de formación del complejo enzima-sustrato (se);  $k_{s2}$ = constante de velocidad de disociación del complejo se;  $k_{m1}$ = constante de velocidad de formación del complejo enzima-sustrato-metanol (sem);  $k_{m2}$ = constante de velocidad para la disociación del complejo sem;  $k_{cat}$ = constante de velocidad catalítica de la reacción;  $k_{g1}$ = constante de velocidad de formación del complejo enzima-glicerol (eg); y  $k_{g2}$ = constante de disociación del complejo eg.

Este modelo puede explicarse de la siguiente manera (figura 6): la lipasa e presente en el sistema interacciona con el sustrato s, en este caso aceite de oliva, para formar un complejo enzima sustrato c. Luego se añade metanol m al sistema, y este interactuará con el complejo c para formar el complejo f, una vez formado este complejo, ocurre la transesterificación catalizada por la lipasa, a una velocidad determinada que está expresada por la constante  $K_{cat}$ . Tal reacción produce metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs) o biodiesel, representado en el modelo como p, además de glicerol g, y libera a la lipasa e

para intervenir en otro ciclo de transesterificación. Dentro del modelo cinético propuesto se tuvo en consideración el efecto inhibitorio que puede tener el glicerol en la actividad enzimática, donde la lipasa interactúa con el glicerol  $g$ , y se forma el complejo enzima- glicerol  $b$ . Por otra parte, se desestimó la inhibición competitiva por metanol, debido a que existen formas de controlar su efecto inactivador, como la metanólisis paso a paso (Shimada et al, 2002, pp. 133-142), y porque la presencia excesiva de glicerol no sólo tiene efectos negativos en la transferencia de masa en la enzima inmovilizada, sino que “secuestra” las moléculas de alcohol y reduce drásticamente la velocidad de conversión (Hong et al, 2011, p, 1908), razones por las que se decidió dar mayor ponderación al efecto inhibitorio del glicerol por sobre el del metanol en la reacción.

Desarrollado el modelo cinético, se procedió a la modelación del comportamiento de la reacción en tres modos de operación de reactores: 1) reactor de tanque agitado por lote discontinuo (batch), 2) reactor de tanque agitado en modo continuo (CSTR), y 3) reactor de flujo pistón de lecho empacado (PFR) de I y II etapas. Estos modelos permitieron comparar el rendimiento teórico que tiene cada reactor con su pertinente modo de operación al momento de transformar los ácidos grasos del aceite de oliva a metil esteres de ácidos grasos.

Los valores utilizados en las constantes del modelo no fueron obtenidas a partir de ningún experimento preliminar, ni se utilizaron los datos obtenidos por otros autores, porque, al contrario de los trabajos de cinética enzimática relacionada a la producción de biodiesel, donde primeramente se produce biodiesel y se controlan las variables a analizar, p. ej., la concentración de sustrato o de metanol, para luego ser acopladas en el modelo cinético desarrollado, y así poder explicar el comportamiento de la reacción (Al-Zuhair et al, 2007, pp. 951-960), en este trabajo se da más importancia al nivel de conversión (eficiencia) en distintos reactores y configuraciones, siguiendo un esquema inverso, primero enfocándose en la modelación, para después determinar si la modelación será de utilidad mediante la comparación de los datos obtenidos

por este medio, y los experimentales. El parámetro de comparación, para determinar el reactor en el que se logró un mayor nivel de conversión en los modelos fue el tiempo de residencia  $\tau$  (tiempo de reacción en el proceso discontinuo).

Los valores de las constantes utilizadas se aprecian en la tabla 3.

**Tabla 3:** Constantes y valores utilizados en la modelación propuesta para los reactores analizados.

<b>Constantes cinéticas</b>	<b>Batch</b>	<b>CSTR</b>	<b>PFR I etapa</b>	<b>PFR II etapas</b>
<b>ks<sub>1</sub></b>	2	2	2	2
<b>ks<sub>2</sub></b>	1	1	1	1
<b>kg<sub>1</sub></b>	50	50	50	50
<b>kg<sub>2</sub></b>	1	1	1	1
<b>km<sub>1</sub></b>	2	2	2	2
<b>km<sub>2</sub></b>	1	1	1	1
<b>K<sub>cat</sub></b>	0.2	0.2	0.2	0.2
<b>Especies reactivas/ complejos</b>	<b>Batch</b>	<b>CSTR</b>	<b>PFR I etapa</b>	<b>PFR II etapas</b>
<b>e<sub>0</sub></b>	5	5	5	5
<b>c<sub>0</sub></b>	0	0	0	0
<b>s<sub>0</sub></b>	100	0	100	50
<b>p<sub>0</sub></b>	0	0	0	50
<b>m<sub>0</sub></b>	50	0	50	50
<b>b<sub>0</sub></b>	0	0	0	0
<b>f<sub>0</sub></b>	0	0	0	0
<b>g<sub>0</sub></b>	0	0	0	46
<b>s<sub>i</sub> ([s] inicial)</b>	-	100	-	-
<b>m<sub>i</sub> ([MeOH] inicial)</b>	-	50	-	-
<b>D (flujo)</b>	-	0.1	0.1	0.1

Los valores de constantes involucradas son aleatorios y adimensionales, pues su finalidad es solamente la de comparar el comportamiento del modelo

propuesto en los tres reactores, y están propuestos de tal forma que el equilibrio de la reacción está orientado hacia la formación de producto. La inhibición por glicerol está considerada en el alto valor de  $k_{g1}$ . Y se considera un flujo modesto (0.1) para permitir un mayor rendimiento de producto. Se observará que los valores iniciales de algunas constantes en el PFR II etapas, son los valores finales de las mismas en el PFR I etapa. Tales valores se obtuvieron después de obtener la simulación gráfica en el PFR I etapa. En la tabla 3 también se observan las variables  $s_i$  (concentración inicial de sustrato) y  $m_i$  (concentración inicial de metanol). Tales variables sólo se consideran en el diseño del CSTR, por la particularidad del proceso al ingresar una sustancia de concentración determinada y eluir la misma sustancia con otra concentración. De igual forma, el flujo D, sólo se considera en el diseño del CSTR y PFR.

El software empleado para la modelación fue el Wolfram Mathematica<sup>®</sup> 8 for Students, el cual permite al investigador desarrollar soluciones numéricas, útiles cuando los cálculos a realizar son extremadamente complejos y tediosos como para calcularlos manualmente.

Antes de introducir los datos al software, en base al modelo de comportamiento cinético desarrollado, se realizaron los respectivos balances de masa para cada reactivo (p. ej., enzima libre, metanol, glicerol) y complejo formado, teniendo en cuenta sus respectivas constantes de velocidad de formación/disociación (p. ej.,  $k_{cat}$ ,  $k_{g1}$ ,  $k_{g2}$ ), para cada uno de los tres modos de operación de reactor propuesto.

Las ecuaciones obtenidas para cada uno de ellos son las siguientes:

### 3.1.1 Balance de masa para reactor de tanque agitado por lote discontinuo (Batch)

Enzima libre:

$$\frac{de}{dt} = k_{g_2} \cdot b + k_{cat} \cdot f - k_{g_1} \cdot e \cdot g - k_{s_1} \cdot s \cdot e + k_{s_2} \cdot c \quad (\text{Ecuación 23})$$

Sustrato:

$$\frac{ds}{dt} = k_{s_2} \cdot c - k_{s_1} \cdot s \cdot e \quad (\text{Ecuación 24})$$

Glicerol:

$$\frac{dg}{dt} = k_{g_2} \cdot b + k_{cat} \cdot f - k_{g_1} \cdot e \cdot g \quad (\text{Ecuación 25})$$

Metanol:

$$\frac{dm}{dt} = k_{m_2} \cdot f - k_{m_1} \cdot c \cdot m \quad (\text{Ecuación 26})$$

Complejo enzima-sustrato:

$$\frac{dc}{dt} = k_{s_1} \cdot s \cdot e - k_{s_2} \cdot c + k_{m_2} \cdot f - k_{m_1} \cdot c \cdot m \quad (\text{Ecuación 27})$$

Complejo enzima-glicerol:

$$\frac{db}{dt} = k_{g_1} \cdot e \cdot g - k_{g_2} \cdot b \quad (\text{Ecuación 28})$$

Complejo enzima-sustrato-metanol:

$$\frac{df}{dt} = k_{m_1} \cdot c \cdot m - k_{m_2} \cdot f - k_{cat} \cdot f \quad (\text{Ecuación 29})$$

Producto:

$$\frac{dp}{dt} = k_{cat} \cdot f \quad (\text{Ecuación 30})$$

### 3.1.2 Balance de masa para reactor de tanque agitado en modo continuo (CSTR)

Enzima libre:

$$\frac{de}{dt} = k_{g_2} \cdot b + k_{cat} \cdot f - k_{g_1} \cdot e \cdot g - k_{s_1} \cdot s \cdot e + k_{s_2} \cdot c \quad (\text{Ecuación 31})$$

Sustrato:

$$\frac{ds}{dt} = k_{s_2} \cdot c - k_{s_1} \cdot t \cdot e + D \cdot s_i - D \cdot s \quad (\text{Ecuación 32})$$

Glicerol:

$$\frac{dg}{dt} = -D \cdot g + k_{g_2} \cdot b + k_{cat} \cdot f - k_{g_1} \cdot e \cdot g \quad (\text{Ecuación 33})$$

Metanol:

$$\frac{dm}{dt} = D \cdot m_i - D \cdot m + k_{m_2} \cdot f - k_{m_1} \cdot c \cdot m \quad (\text{Ecuación 34})$$

Complejo enzima-sustrato:

$$\frac{dc}{dt} = k_{s_1} \cdot t \cdot e + k_{m_2} \cdot f - k_{m_1} \cdot c \cdot m \quad (\text{Ecuación 35})$$

Complejo enzima-sustrato-metanol:

$$\frac{df}{dt} = k_{m_1} \cdot c \cdot m - k_{m_2} \cdot f - k_{cat} \cdot f \quad (\text{Ecuación 36})$$

Complejo enzima-glicerol:

$$\frac{db}{dt} = k_{g_1} \cdot e \cdot g - k_{g_2} \cdot b \quad (\text{Ecuación 37})$$

Producto:

$$\frac{dp}{dt} = -D \cdot p + k_{cat} \cdot f \quad (\text{Ecuación 38})$$

Donde D representa al flujo en el sistema.

### 3.1.3 Balance de masa para reactor de flujo pistón de lecho empacado (PFR)

Enzima libre:

$$\frac{de}{dx} = \frac{k_{g_2} \cdot b}{D} + \frac{k_{cat} \cdot f}{D} - \frac{k_{g_1} \cdot e \cdot g}{D} - \frac{k_{s_1} \cdot s \cdot e}{D} + \frac{k_{s_2} \cdot c}{D} \quad (\text{Ecuación 39})$$

Sustrato:

$$\frac{ds}{dx} = \frac{k_{s_2} \cdot c}{D} - \frac{k_{s_1} \cdot t \cdot e}{D} \quad (\text{Ecuación 40})$$

Glicerol:

$$\frac{dg}{dx} = \frac{k_{g_2} \cdot b}{D} + \frac{k_{cat} \cdot f}{D} - \frac{k_{g_1} \cdot e \cdot g}{D} \quad (\text{Ecuación 41})$$

Metanol:

$$\frac{dm}{dx} = \frac{k_{m_2} \cdot f}{D} - \frac{k_{m_1} \cdot c \cdot m}{D} \quad (\text{Ecuación 42})$$

Complejo enzima-sustrato:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{k_{s_1} \cdot s \cdot e}{D} + \frac{k_{m_2} \cdot f}{D} - \frac{k_{s_2} \cdot c}{D} - \frac{k_{m_1} \cdot c \cdot m}{D} \quad (\text{Ecuación 43})$$

Complejo enzima-sustrato-metanol:

$$\frac{df}{dx} = \frac{k_{m_1} \cdot c \cdot m}{D} - \frac{k_{m_2} \cdot f}{D} - \frac{k_{cat} \cdot f}{D} \quad (\text{Ecuación 44})$$

Complejo enzima-glicerol:

$$\frac{db}{dx} = \frac{k_{g_1} \cdot e \cdot g}{D} - \frac{k_{g_2} \cdot b}{D} \quad (\text{Ecuación 45})$$

Producto:

$$\frac{dp}{dx} = \frac{k_{cat} \cdot f}{D} \quad (\text{Ecuación 46})$$

## **3.2 Etapa II: experimentación**

Los datos se analizaron en función del modelo teórico más eficiente en la conversión teórica de aceite a biodiesel. Una vez elegido el modelo, este fue desarrollado como fase experimental con el fin de corroborar la veracidad de los modelos teóricos.

En base a los modelos teóricos, se decidió probar experimentalmente los reactores con modo de operación por lote discontinuo (batch) y flujo pistón de lecho empacado de I y de II etapas.

### **3.2.1 Inmovilización enzimática**

La enzima que se utilizó fue la lipasa comercial de *R. oryzae* de Sigma-Aldrich® de 10 U/mg, debido a su capacidad de obtener altos niveles de conversión (>80%) y de hidrolizar tri-di, monoglicéridos y FFA (Fjerbaek et al, 2009, pp. 1298-1312). La inmovilización enzimática en cápsulas de quitosano, por unión covalente y entrecruzamiento, se basó en el protocolo desarrollado por Velasteguí, 2014, pp. 40-42 (figura 7):

Para la formación de un lote de cápsulas:

1. Se pesó 0.11 g de quitosano (Sigma-Aldrich®), y se colocó en un plástico para pesaje, donde se añadió 1.5 mL de agua destilada. Después se añadió 0.7 mL de ácido acético 5 M. Se mezcló el contenido hasta homogeneizarlo.
2. Una solución NaOH 1 M fue colocada en un vaso de precipitación. Se colocó el vaso sobre una plancha de calentamiento analógica con agitador magnético Isotemp® Fisher Scientific, y se procedió a agitar la solución.
3. Se introdujo el polímero resultante de (1) en una jeringuilla, y cuidadosamente se dejó gotear el gel en el vaso de precipitación con NaOH.

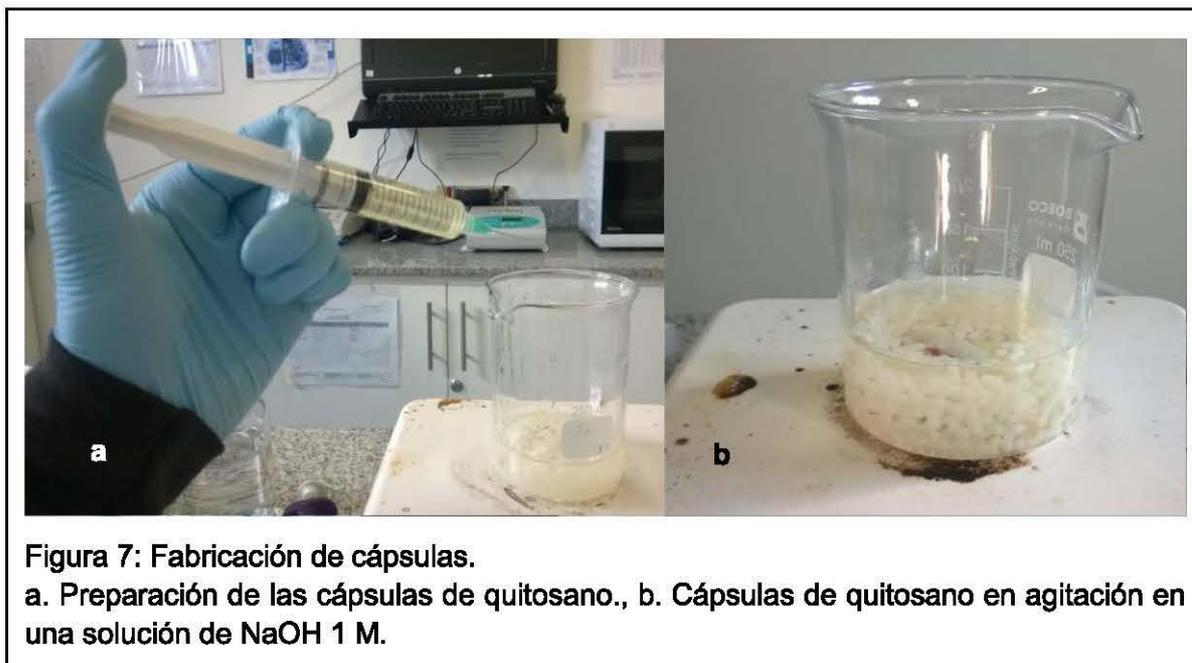
4. La solución con las cápsulas se agitó durante toda la noche.
5. Finalmente, las cápsulas se lavaron en agua destilada al menos 3 veces, y se depositaron en un tubo Corning® PP (polipropileno) con tapa, de 50 mL.

Para la activación de las cápsulas:

1. Se añadió 250 µL de una solución acuosa de glutaraldehído al 25% (Merck®) y 9.75 mL de buffer bicarbonato pH 10, al tubo que contenía las cápsulas.
2. Se acopló el tubo en un rotor de tubos Labnet LabRoller™ II a 35 rpm por un tiempo de 70 minutos, a temperatura ambiente.
3. Las cápsulas se lavaron con agua destilada al menos 3 veces.

Para inmovilización de lipasas:

1. Se preparó una solución de enzima lipasa en polvo de *Rhizopus oryzae* (Sigma-Aldrich®) en buffer fosfato pH 7 a una concentración de 2 mg/mL.
2. En un tubo Corning® PP, con tapa de 50 mL, que contenía las cápsulas, se añadió 9 mL de buffer bicarbonato pH 10, y 1 mL de solución enzimática.
3. Se introdujo el tubo dentro del rotor de tubos y se dejó durante toda la noche a 35 rpm y temperatura ambiente.
4. Finalmente se eliminó la solución del tubo dejando sólo las cápsulas con lipasas inmovilizadas listas para utilizarse.



### 3.2.2 Producción de biodiesel (transesterificación)

Antes de la producción de biodiesel, se definió un tiempo de residencia  $\tau$  de 30 horas, en base al estudio realizado por Chen et al, (2006, pp. 911-921), y un volumen de reactor de 50 mL, para facilitar su manipulación y reducir el costo de su construcción. Una vez definido el tiempo de residencia, se procedió a calcular la velocidad de flujo (anexo 1). Para el proceso en el reactor batch, no se calculó tiempo de residencia, debido a que en este no existe entrada ni salida de material. Pero el tiempo de reacción se consideró igualmente en 30 horas.

En cuanto a la producción de biodiesel (figura 8), se realizaron tres repeticiones por cada modo de operación para comprobar la afinidad entre los resultados, y lograr estandarizar el método de producción.

El sustrato que se utilizó fue aceite de oliva extra virgen de la casa comercial La Española (anexo 2), al ser un producto asequible, económico y refinado.



Figura 8: Sistema utilizado para la producción de biodiesel.

a. El aceite de oliva (a) es homogeneizado junto al metanol y el agua gracias a una plancha de calentamiento con agitador magnético. Esta solución es transportada por una manguera por medio de una bomba peristáltica (b), hasta el reactor (c) que está suspendido en agua a una temperatura controlada de 50°C por un circulador de inmersión. Finalmente, el biodiesel junto con el glicerol se deposita en un embudo de precipitación (d).

El alcohol utilizado como aceptor acilo fue el metanol. Cabe señalar que en todos los experimentos, la proporción molar aceite metanol utilizada fue de 4:1, el volumen de metanol calculado fue dividido en tres partes iguales, y añadidas a los reactores en los tiempos  $t_1= 0h$ ,  $t_2= 10h$ , y  $t_3=24h$ . La proporción molar aceite: metanol y los tiempos de metanólisis paso a paso, se consideraron según sugiere el estudio de Chen et al, (2006, pp. 911-921).

El agua destilada necesaria fue obtenida por medio de un destilador de agua BOECO® WS 7500.

### 3.2.2.1 Modo de operación de tanque agitado por lote discontinuo

Se utilizó como recipiente un tubo Corning® PP con tapa de 50 mL con fondo cónico para centrífuga, en el cual se introdujeron 30 mL de sustrato, las especies reactivas (metanol y agua), además de 4 lotes de cápsulas con enzima inmovilizada. Para homogeneizar, se acopló el tubo Corning® PP a un rotor de tubos (figura 9). Paso seguido, este rotor de tubos se introdujo en una incubadora M.R.C. Ltd. a 50°C para que ocurra la transesterificación. Para 30 mL de aceite de oliva, se utilizó 299 µL de metanol, y 4% del peso del aceite en agua destilada (1.2 mL). Además de la corrida original, se realizaron tres repeticiones del experimento.

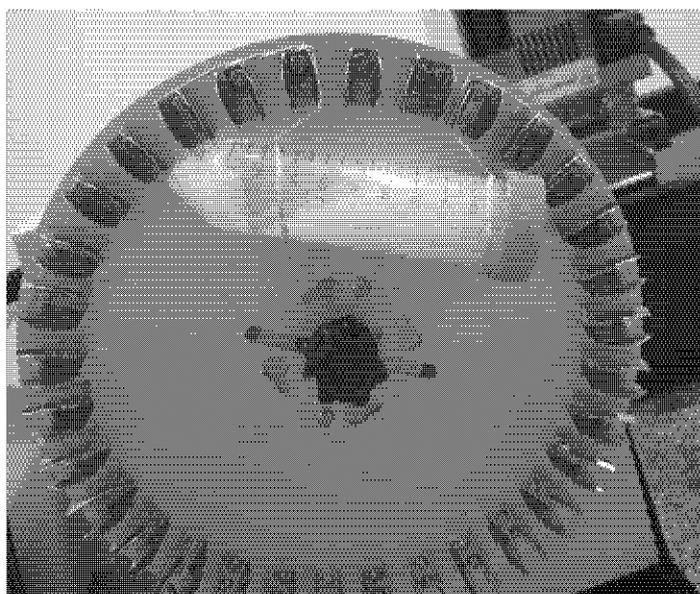


Figura 9: Reactor discontinuo de tanque agitado (batch) en un rotor de tubos.  
a. Se pueden apreciar las cápsulas de quitosano en el interior del tubo Corning® PP.

### 3.2.2.2 Modo de operación de flujo pistón de lecho empacado (PFR)

Se construyeron dos cilindros de acrílico de 50 mL tapados a ambos lados y con orificios en cada tapa para permitir el ingreso de mangueras Masterflex® L/S® 13, diseñadas para ser acopladas a una bomba peristáltica de precisión Cole-Palmer® Masterflex® L/S® Modelo 77202-60 (figura 10).

El tiempo de residencia  $\tau$  para el PFR de una etapa fue de 30h. El flujo del aceite que ingresó a este reactor fue de 0.02 mL/min. Para la configuración de dos etapas, el flujo de entrada fue de 0.08 mL/min para  $\tau = 10$  h (primer reactor), y de 0.04 mL/min para  $\tau = 20$  h (segundo reactor) (anexo 1). Alrededor de 4 lotes de cápsulas con enzimas inmovilizadas fueron introducidos en cada cilindro. Para 100 mL de aceite de oliva utilizados para este modo de operación, se utilizó 987  $\mu$ L de metanol, y 4 mL de agua (4% p/p aceite). La temperatura de reacción fue controlada por un circulador de inmersión Polystat® Cole-Palmer®, a 50°C (figura 8.c). Además de las corridas originales, se realizaron tres repeticiones del experimento por cada configuración (I y II etapa), resultando un total de 8 experimentos en este modo de operación.

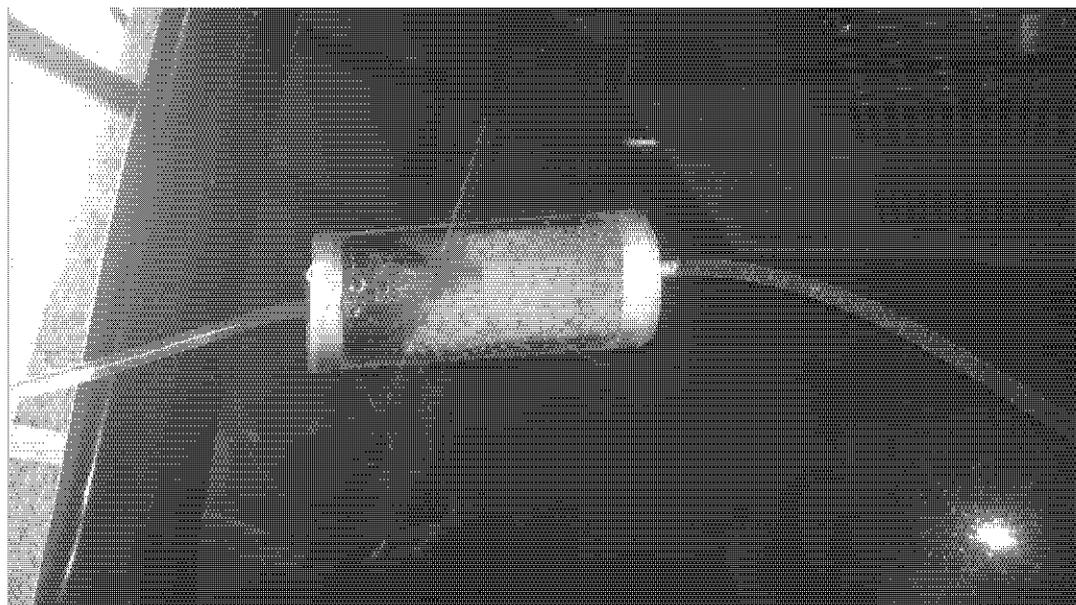


Figura 10: Reactor de flujo pistón de lecho empacado (PFR).

a. Se puede observar el biodiesel ingresando al reactor (sustancia amarilla) y las cápsulas de quitosano (esferas blancas) que contienen a la enzima inmovilizada.

### 3.2.3 Medición cuantitativa de glicerol

El glicerol formado en cada experimento fue eliminado mediante centrifugación a la máxima revolución con un equipo BOECO® U-320R y almacenado en tubos para centrífuga con tapa. Posteriormente se extrajo el glicerol obtenido de cada tipo de reactor, y fue pesado. En base a su densidad, fue posible obtener el volumen exacto del glicerol que se produjo en cada repetición y tipo de reactor (glicerol obtenido). Con estas mediciones, se procedió a calcular parámetros estadísticos: la desviación estándar y la variación (tabla 4), con la finalidad de comprobar la precisión del método.

Paso seguido, se calculó la cantidad de glicerol esperada considerando una muestra de 100 mL de biodiesel de aceite de oliva. Para ello se consideró la composición de ácidos grasos en este aceite, y en base al glicerol esperado, se pudo obtener el nivel de conversión de FAMES a biodiesel utilizando el volumen de glicerol obtenido (anexo 3).

### 3.2.4 Cálculo de productividad volumétrica $Q_p$

Para sustentar los resultados relativos al nivel de conversión de TAGs a FAMES obtenidos por la medición de glicerol, se procedió a calcular la productividad volumétrica en cada modo de operación analizado (batch, PFR I y II etapas), que se refiere a la cantidad (g) de biodiesel que fue obtenida por cada litro de reacción por cada hora utilizando la siguiente ecuación:

$$Q_p = \frac{C_{B,final} - C_{B,inicial}}{\tau} \quad \text{(Ecuación 47)}$$

Donde  $C_B$ , da cuenta de la concentración de biodiesel (g/L). El término  $\tau$  tiene significados diferentes según el proceso en cuestión. Es decir, para el proceso en batch,  $\tau$  hace referencia al tiempo de reacción, mientras que para el proceso en flujo pistón,  $\tau$  se suplanta por la siguiente ecuación:

$$t_{PF} = \frac{l}{v} \quad \text{(Ecuación 48)}$$

Esta ecuación simplemente da cuenta del tiempo que el fluido ha permanecido en el reactor. El término  $l$  es la longitud que el sustrato a recorrido en el reactor por un período dado de tiempo, y  $v$  es la velocidad del fluido (sustrato) en la dirección axial del reactor (Thayer School of Engineering at Dartmouth, 2003, pp. 1-8).

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Modelación teórica de reactores**

El objetivo de la modelación fue determinar en qué tipo de reactor se produce el mayor nivel de conversión de sustrato a producto en el menor tiempo de residencia  $\tau$ .

En base a los modelos teóricos, se decidió probar experimentalmente los reactores con modo de operación por lote discontinuo (batch) y flujo pistón de lecho empacado de I y de II etapas. Como se aclaró anteriormente, en la simulación del proceso batch, no se considera un tiempo de residencia, sino un tiempo de reacción, pues debido a la naturaleza del proceso, no ingresa ni egresa ningún material del reactor (Liu, 2013, p. 141).

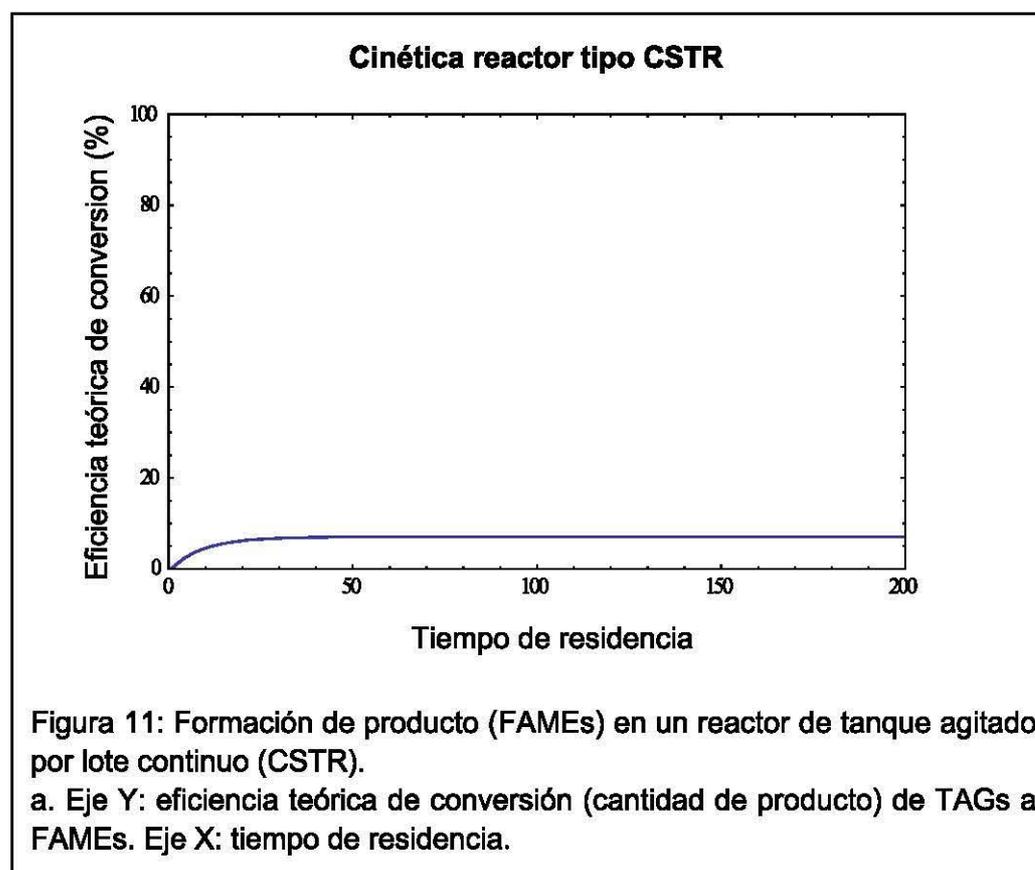
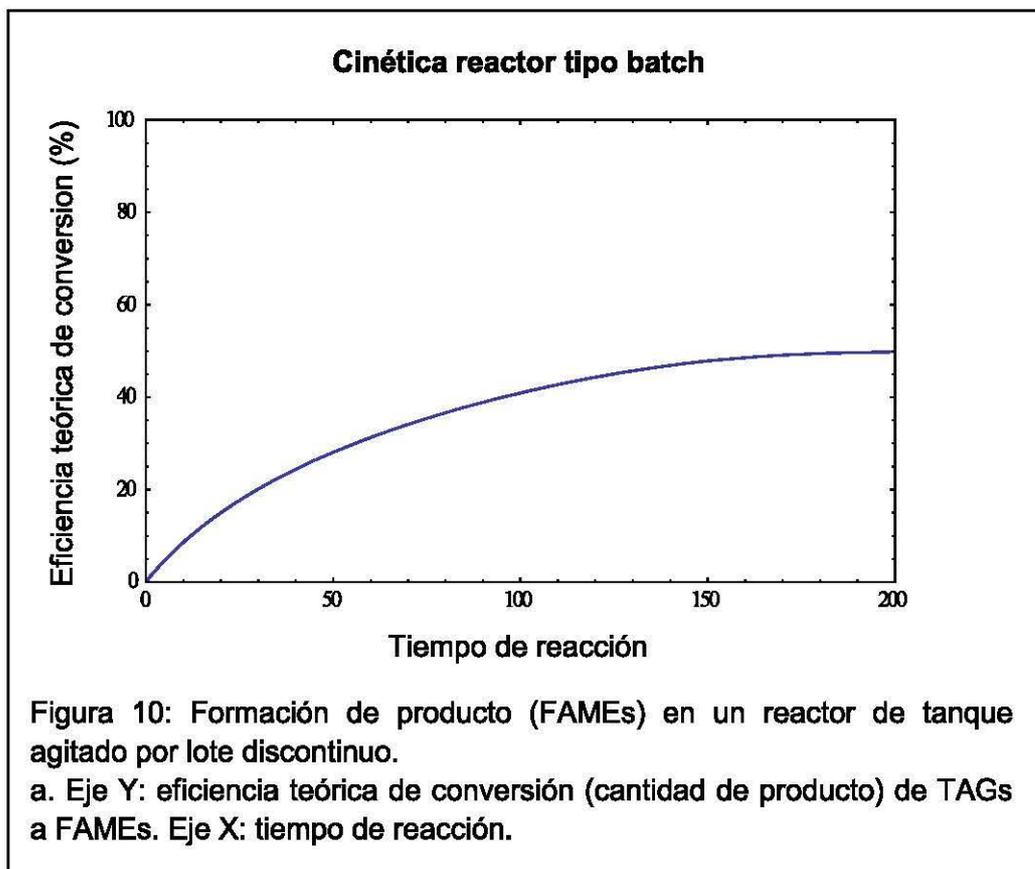
El mecanismo enzimático de reacción considerado fue el de Ping Pong Bi- Bi, el cual describe el proceso por el cual las lipasas llevan a cabo la transesterificación (Illanes y Altamirano, 2008, pp. 124-127). La complejidad de los modelos desarrollados para explicar este tipo de reacciones se hace evidente cuando se toma en consideración la formación de especies y complejos intermediarios, como por ejemplo, los diglicéridos y monoglicéridos que se han formado como resultado de la hidrólisis y esterificación de la molécula de triglicérido por la lipasa (Cheirslip et al, 2008, pp. 261-269).

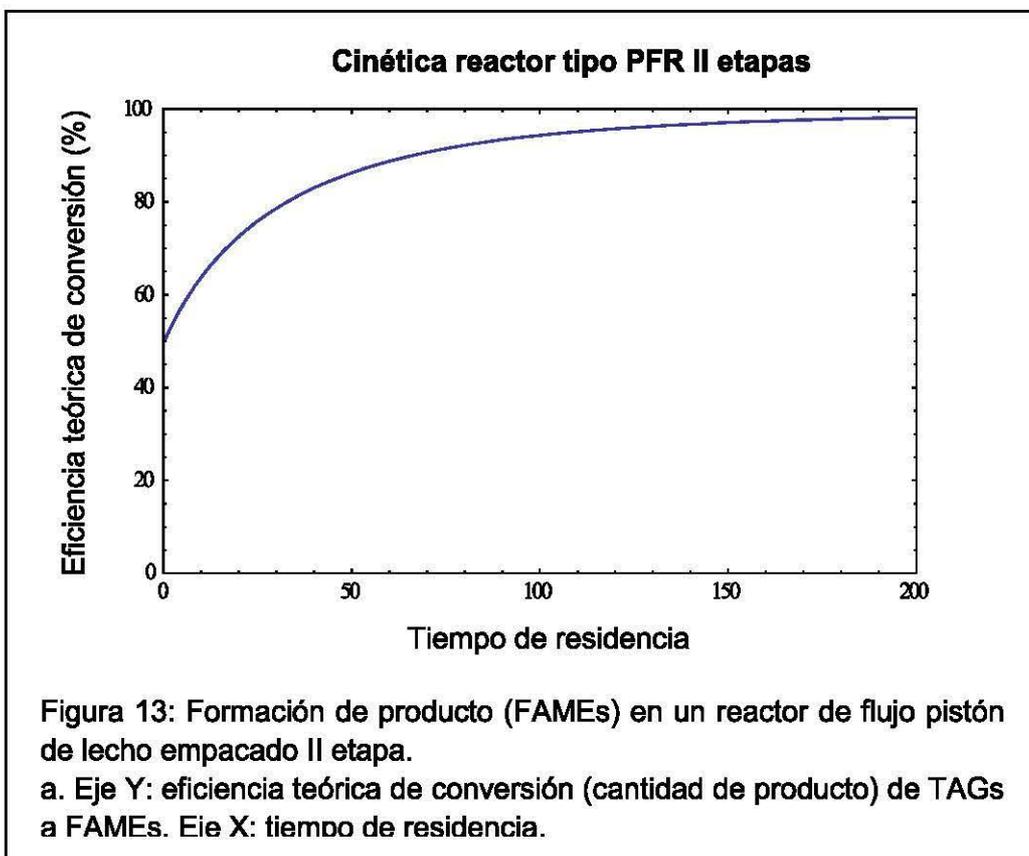
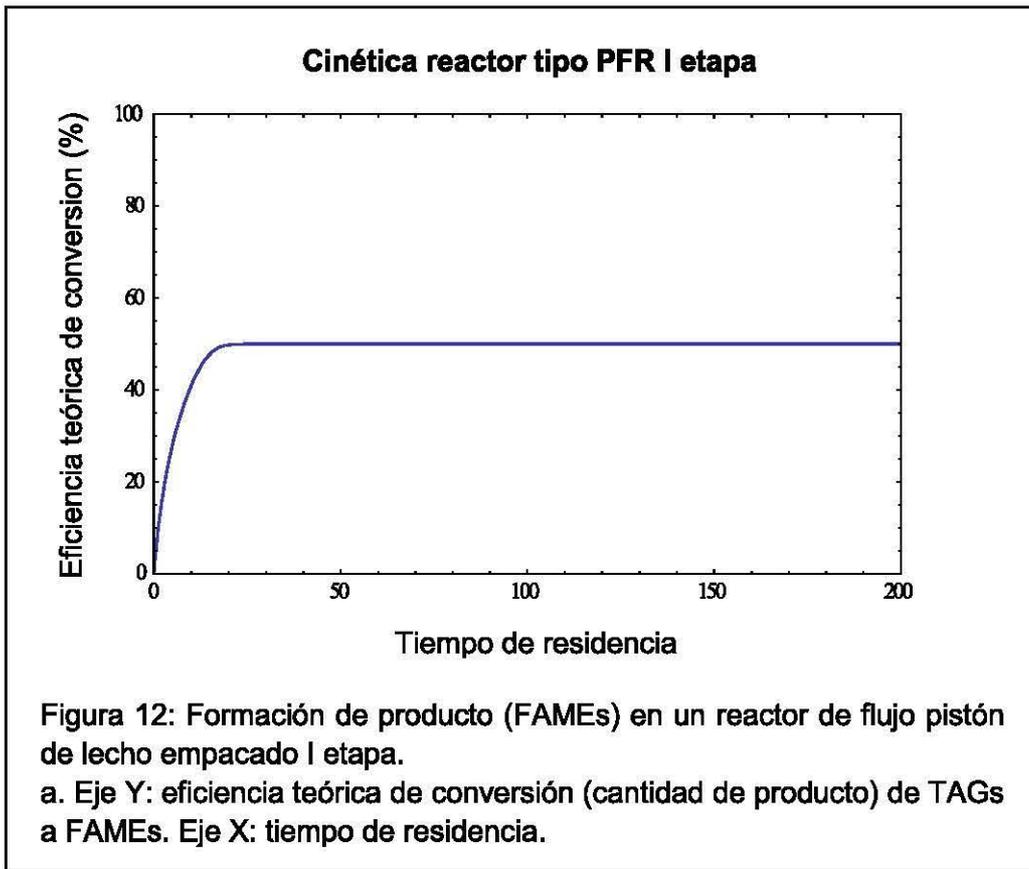
El modelo desarrollado en este trabajo no toma en consideración la formación de intermediarios, de modo que se consideró al sustrato (triglicéridos: TAGs) y sus respectivos componentes (diglicéridos y monoglicéridos), como parte de la variable  $s$  del modelo (figura 6). Esto debido a que el enfoque está dirigido a encontrar el reactor más eficiente al momento de producir biodiesel por vía enzimática, más no en entender los efectos que tienen tales intermediarios en el comportamiento de la reacción, razón por la que se optó por un esquema simplificado, que de todas maneras, toma en cuenta la interacción y formación de complejos entre las especies reactivas y la inhibición por glicerol, parámetros importantes a tener en cuenta en la transesterificación enzimática

(Hong et al, 2011, pp. 1908-1912). No obstante, de ninguna manera se está sugiriendo despreciar en futuros estudios a aquellos trabajos que dan cuenta del efecto que estos intermediarios, y otras variables puedan tener en el diseño de biorreactores enzimáticos.

El tiempo de residencia/ reacción que se estipuló como referencia fue de 200. En este caso no se consideran unidades, pues debido a la aleatoriedad de los valores adjudicados a las variables consideradas (tabla 3), y a la finalidad del modelo, es indiferente si se habla de minutos u horas. Se obtuvieron simulaciones para los reactores batch, CSTR y PFR de I y de II etapas (figuras 10, 11, 12 y 13). En la simulación del reactor tipo batch (figura 10), la reacción alcanzó su mayor porcentaje de eficiencia teórica de conversión (50%), en un tiempo de reacción de 200. En la simulación del reactor tipo CSTR (figura 11), el porcentaje de eficiencia teórica de conversión apenas alcanzó el 7%, en un tiempo de residencia de 50. No obstante, a partir de ese punto, no se aprecia ningún tipo de actividad enzimática y por tanto, no hay más producción de biodiesel. En los reactores tipo PFR de configuración I (figura 12) y II etapas (figura 13), se aprecia la mayor eficiencia teórica de conversión de los tres tipos de reactores, alcanzando 50% en un  $\tau$  de 20 en el PFR I etapa. Tomando los datos finales de la primera etapa de este modo de operación, se corrió la simulación para el PFR de II etapas, que representa el ingreso del material proveniente del primer reactor (sustrato, producto y glicerol), al segundo reactor, de modo que la reacción puede continuar con un surtido nuevo de enzimas. La eficiencia teórica de conversión en esta segunda etapa alcanzó alrededor de 98% en un tiempo de residencia considerablemente mayor: 200.

Antes de discutir la validez de los modelos obtenidos, y compararlos con el sustento experimental, es necesario introducir esta segunda fase con la elección de los parámetros de las variables y procesos que se utilizaron para la producción de biodiesel.





## 4.2 Producción de biodiesel

Existe una cantidad considerable de bibliografía dedicada a la producción de biodiesel, pero la mayoría de estos trabajos se centra solamente en la producción discontinua de biodiesel (Tan et al, 2010, pp. 628-634). En el presente trabajo, se dio especial énfasis a la producción continua de biodiesel utilizando el modo de operación PFR.

En base a la bibliografía disponible, se establecieron las cantidades, volúmenes y proporciones de los reactantes que intervienen en el proceso, tomando como parámetro más importante la actividad de las enzimas, es decir, las cantidades o proporciones utilizadas de los diversos reactantes, según los estudios citados más adelante, son las más recomendables para alcanzar un nivel de conversión cercano al 100%.

La actividad de agua, por ejemplo, es un factor muy importante a considerar en la producción de biodiesel. Se ha demostrado que las lipasas necesitan aunque sea una mínima cantidad de agua para ser estructuralmente funcionales y activas, que puede variar del 1 al 20% (p/p). La lipasa de *Rhizopus oryzae* se desempeña mejor con una actividad de agua que varía desde el 30% al 50% (Ghaly et al, 2010, p. 67). Sin embargo, en el presente estudio se utilizó un contenido de agua del 4% (p/p), pues según Chen et al, (2006, p. 918), para transesterificar aceites puros, se ha demostrado que con un contenido de agua del 2% al 4% (p/p), la lipasa de *R. oryzae* produce los niveles más altos de conversión. Los porcentajes mayores cabe resaltar, generalmente son utilizados cuando la materia prima es aceite de desecho (Chen et al, 2006, p. 918).

Tan importante como la actividad de agua para la producción de biodiesel, es la proporción alcohol: aceite. Es necesario que el aceptor acilo se encuentre en exceso para que la reacción proceda hacia la formación de producto. La inactivación de las enzimas se produce cuando la proporción metanol: aceite es superior a 1:1, y la proporción mínima para conseguir un rendimiento adecuado es de 3:1 (Shimada et al, 2001. pp. 134-136). Chen et al, (2006, pp. 917-918) propuso el uso de una proporción 4:1 metanol: aceite como la más adecuada,

y, para evitar la inactivación enzimática, una adición seriada de alcohol en diferentes tiempos comprobó que el porcentaje de conversión fue cerca del 100%, utilizando lipasa de *R. oryzae*. Esa es la razón por la que se empleó tal proporción para el presente trabajo. Es importante resaltar, que a pesar de su efecto inactivador, el tipo elegido de alcohol puede influir en gran medida en el desempeño de la reacción, las especies más utilizadas son el metanol y el etanol, pero se ha reportado que los mayores niveles de ésteres de alcoholes se han obtenido con el uso del metanol como aceptor acilo, esto debido a la cadena corta del mismo, lo que supone una mayor dilución y reactividad con el aceite (Bajpai y Tyagi, 2006, pp. 490-491).



Figura 14: Biodiesel (amarillo) y glicerol (precipitado transparente) obtenidos después del proceso de transesterificación.

Para la alcanzar una buena actividad en la lipasa inmovilizada de *R. oryzae*, se estipuló una temperatura de reacción de 50°C, pues aunque la mayoría de lipasas trabajan de forma adecuada a temperaturas de 60°C (Ghaly et al, 2010, p. 67; Meher et al, 2004, p. 257), se ha observado que la temperatura óptima de reacción de la lipasa de *R. oryzae* se encuentra en el rango de 40-50°C, con un decremento considerable de su actividad a partir de los 55°C (Chen et al, 2006, p.917).

Ahora bien, es necesario recordar que los resultados de la modelación indicaron que el reactor con mayor nivel de conversión en el menor tiempo de residencia fue el PFR. Pero, de qué manera es posible comprobar o refutar esta información?

### **4.3 Cantidad de glicerol producida como indicador del porcentaje de conversión del biodiesel**

Existe una gran variedad de métodos cromatográficos que permiten de forma cuantitativa conocer el nivel de conversión alcanzado, no obstante, también existen métodos menos complejos y demandantes en cuestión de tiempo y recursos que permiten obtener estimaciones útiles del nivel de conversión (Blair, 2013). Debido a que el glicerol es un producto secundario intrínseco de una reacción de transesterificación de ácidos grasos (figura 14), en este trabajo se propuso utilizarlo como un indicador directo del grado de conversión de TAGs a FAMES (El-Shimi et al, 2013). En términos estequiométricos, en una reacción de transesterificación, por cada mol de TAG que reacciona, se produce un mol de glicerol. Dicho en otras palabras, un mayor volumen de glicerol obtenido al finalizar la reacción, puede significar un mayor porcentaje de conversión (El-Shimi et al, 2013). La tabla 4 muestra los volúmenes de glicerol obtenidos para cada modo de operación de reactor propuesto. El cálculo del coeficiente de variación demuestra que las mediciones de glicerol provenientes del PFR son muy precisas, de modo que el método es fiable.

**Tabla 4:** Mediciones de glicerol obtenidos de los diferentes modos de operación.

<b>Modo de operación</b>	<b>Original (mL)</b>	<b>1ra repetición (mL)</b>	<b>2da repetición (mL)</b>	<b>3ra repetición (mL)</b>	<b><math>\bar{X}</math> glicerol (mL)</b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>Cv (%)</b>
<b>Batch</b>	1.61	1.53	1.85	1.12	1.62	0.150	9.2
<b>PFR I etapa</b>	3.48	3.57	3.42	3.62	3.52	0.085	0.8
<b>PFR II etapas</b>	3.59	3.52	3.67	3.71	3.62	0.090	0.7

a. Se muestra el promedio de glicerol obtenido en cada uno, y parámetros estadísticos (desviación estándar  $\sigma$ , y coeficiente de variación Cv), que demuestran la precisión de las mediciones.

Por otra parte, se detecta una variación del 9.2% en las mediciones provenientes del reactor batch. Si bien es difícil determinar la causa concreta de tal variación, existe tanto la posibilidad de que la agitación del sistema (Tan et al, 2010, p. 632), como errores de medición al momento de extraer el glicerol, expliquen este fenómeno, que no obstante, se encuentra en un rango de precisión aceptable.

Cabe señalar que los resultados obtenidos de la medición del glicerol (tabla 5), arrojan resultados conflictivos respecto a la modelación, donde el modo de operación PFR fue el más efectivo al momento de convertir TAGs a FAMEs, en el menor tiempo de residencia, pero al momento de producir biodiesel en los reactores, los resultados demuestran claramente que el modo de operación discontinuo de tanque agitado (batch), por lejos, fue el más eficiente en el mismo tiempo de residencia (tabla 6).

Para reforzar estos resultados, se procedió a realizar el cálculo de la productividad volumétrica  $Q_p$  en cada modo de operación. Los resultados pueden apreciarse en la tabla (5), donde se observa que el modo de operación con mayor productividad volumétrica es el batch, seguido por el PFR de II etapas, y finalizando con el PFR de I etapa. En este punto es preciso mencionar que, aunque la productividad volumétrica haya resultado ampliamente superior en el proceso discontinuo, no se pueden obviar las

ventajas operacionales que supone el uso del proceso continuo en flujo pistón, entre las más evidentes se encuentra la ausencia de tiempos muertos, es decir, la rapidez con la que se puede recuperar el producto sin necesidad de detener la producción, ni forzar al reactor, además de evitar cualquier tipo de pérdida de biocatalizador, y la facultad de eliminar el glicerol del sistema sin comprometer al mismo. Por otra parte, si bien de el proceso batch resultó la mayor  $Q_p$ , hay que considerar que este modo de operación requiere detener la producción para recuperar el producto, donde se incluye el glicerol, además de mantener dentro del reactor las enzimas inmovilizadas, lo que hace una tarea sumamente trabajosa y puede repercutir en la productividad volumétrica del sistema.

**Tabla 5:** Productividad volumétrica de biodiesel en distintos modos de operación.

<b>Modo de operación</b>	<b>Batch</b>	<b>PFR I etapa</b>	<b>PFR II etapas</b>
<b>Productividad volumétrica <math>Q_p</math> (g/L.h)</b>	29.32	7.91	11.58

**Tabla 6:** Porcentaje de conversión de TAGs procedentes de aceite de oliva a biodiesel (FAMEs).

<b>Modo de operación</b>	<b><math>\bar{X}</math> glicerol (mL)</b>	<b>Aceite de oliva (mL)</b>	<b>% conversión TAGs a FAMEs</b>
<b>Batch</b>	1.62	30.00	74.31
<b>PFR I etapa</b>	3.52	100.00	48.35
<b>PFR II etapas</b>	3.62	100.00	49.90

a. Se ha utilizado como referencia al volumen de sustrato (aceite de oliva) y de glicerol producido

A continuación, se discuten las posibles razones por las que se pudo producir tal discrepancia entre los resultados obtenidos de la simulación teórica, y la experimentación.

#### **4.4 Modelación en reactor tipo batch y producción de biodiesel**

La simulación de la reacción de transesterificación se aprecia en la figura 10, donde demuestra que el reactor batch puede alcanzar niveles considerables de conversión, pero el tiempo de residencia para lograr tal puede resultar ser demasiado largo. Una de las razones por las que el tiempo de residencia es tan largo (10 veces mayor que el  $\tau$  necesario para lograr el mismo nivel de conversión en el PFR), es por la exposición de la enzima inmovilizada al estrés mecánico causado por la constante agitación en el sistema, con la consecuente reducción de la actividad catalítica de las lipasas, la destrucción del transportador, y la contaminación del producto (Tufvesson et al, 2010, p. 6), sin mencionar la imposibilidad de reutilizar las enzimas (Tan et al, 2010, pp. 628-634).

No obstante, los resultados experimentales fueron sorprendentes. Utilizando 30 mL de aceite de oliva, se obtuvo un porcentaje de conversión de alrededor de 74.31%, en un  $\tau$  de 30h. Tal rendimiento puede entenderse si se recuerda que se utilizó un rotor de tubos para proveer de agitación a la mezcla, eliminando así el problema de destrucción de cápsulas y actividad enzimática. De hecho, en las corridas de prueba, se utilizó un vaso de precipitación como recipiente, y se proveyó de agitación con un magneto, el cual terminó por pulverizar totalmente a las cápsulas de quitosano. Cabe señalar que no se obtuvo glicerol de esta corrida, de modo que se puede afirmar que la producción de FAMES fue, en el mejor de los casos, insignificante. Por tal razón se optó por utilizar el medio de agitación antes mencionado (figura 9), modificación que al parecer tuvo mucha influencia en el alto rendimiento de biodiesel observado.

Otra posible explicación del alto porcentaje de conversión de TAGs a FAMES, se deba al volumen de sustrato disponible en relación con la cantidad de

enzima inmovilizada, que se utilizó en este modo de operación. Es decir, se utilizaron alrededor de 4 lotes de cápsulas con enzima inmovilizada para cada reactor (metodología), pero la diferencia recae en que el volumen de aceite de oliva asignado para las configuraciones de PFR fue de 100 mL, mientras que para el batch, fue de apenas 30 mL (tabla 6), debido a que los tubos Corning® PP tienen un volumen de 50 mL, del cual gran parte ocupaban las cápsulas. Dicho de otro modo, había menos sustrato y más enzimas disponibles para efectuar la catálisis, lo que pudo haber influido favorablemente para que se produzca un alto rendimiento, y por consiguiente, una mayor productividad volumétrica que sus contrapartes en proceso continuo (tabla 5).

#### **4.5 Modelación en reactor tipo CSTR**

El porcentaje de eficiencia teórica de conversión más bajo fue el registrado en el reactor tipo CSTR, alcanzando apenas 7% en un  $\tau$  aproximado de 30, después del cual, no se percibe ningún tipo de actividad debido a la productividad nula observada en el gráfico (figura 11). Debido a los bajos niveles de conversión, se obvió la construcción de este reactor. Tal comportamiento se debe a su modo de operación, en el cual se toma en cuenta el ingreso y la salida de material. Uno de los principales inconvenientes, y quizá la explicación del bajo rendimiento en este tipo de reactor, es la necesidad de un gran volumen, de hecho considerablemente mayor que el requerido en otros reactores como el PFR, para lograr el mismo nivel de conversión que este último. Por ejemplo, para una constante de velocidad  $k=0.02/s$  y un flujo de 10 L/s, el volumen que un CSTR necesita para alcanzar en 50% de conversión es de 500 L, a diferencia de los 346 L en un PFR (Liu, 2013, p. 198), lo que se traduce en la necesidad de un mayor tiempo de residencia y mayor cantidad de reactivos. La salida de material del reactor, puede convertirse igualmente en un problema, pues se puede perder sustrato que no ha sido transformado, alcohol sin reaccionar, e inclusive enzima inmovilizada. Para evitar estos problemas, en caso de elegir este modo de operación, la posición del conducto de salida y la

implantación de microfiltros en este puede resultar fundamental para optimizar el rendimiento en un CSTR (Murty et al, 2002, pp. 63-65).

#### 4.6 Modelación en reactor tipo PFR y producción de biodiesel

El modelo computarizado del modo de operación de flujo pistón de lecho empacado desprendió el mejor resultado en cuanto al porcentaje de eficiencia teórica de conversión (figura 12), pues en un tiempo de residencia  $\tau$  de 20 (el menor de todos), alcanzó el mismo valor que en el proceso batch (50%,  $\tau$ : 200).

Al momento de construir este reactor, se tomó en consideración el glicerol que sería producido, y los potenciales efectos inhibitorios que puede tener sobre las lipasas, de modo que se añadió un filtro para evitar el contacto entre el glicerol y las cápsulas, lo que a su vez facilitó la extracción de este producto. Hama et al, (2011, pp. 10419-10424) diseñó un sistema con finalidad similar, el cual consiste en tanques separadores de glicerol ubicados debajo de los PFR, un proceso con potencial uso para la producción industrial de biodiesel.

**Tabla 7:** Resumen de resultados teóricos y experimentales de la transesterificación enzimática de TAGs en biorreactores con diferentes modos de operación.

Modo de operación	Modelación	Experimentación					
	% Eficiencia teórica de conversión; $\tau$	$T$ (h)	Aceite de oliva (mL)	$\bar{X}$ glicerol obtenido (mL)	Volumen Glicerol esperado (mL)	% Conversión TAGs a FAMES	Qp (g/L.h)
Batch	50; $\tau$ :200	30	30	1.62	2.18	74.31	29.32
CSTR	7; $\tau$ :30	30	-	-	-	-	-
PFR I	50; $\tau$ :20	30	100	3.52	7.28	48.35	7.91
PFR II	98; $\tau$ :200	30	100	3.62	7.28	49.90	11.58

A pesar de los aparentes beneficios operacionales con que cuenta este modo de operación, las mediciones de glicerol mostraron que apenas se logró un nivel de conversión del 48.35% (tabla 6) en el PFR de I etapa, que destaca por

ser bastante bajo (tabla 7), a diferencia de los declarados en varios trabajos, donde alcanzan sin dificultad el 80% (Chen et al, 2006, pp. 668-673; Halim et al, 2009, pp. 710-716). La siguiente puede ser una posible explicación a este asunto:

En la etapa experimental, la velocidad de flujo en el PFR fue establecida en 0.02 mL/min, y la altura del reactor de 10 cm. Se mencionan estas dos variables porque se ha determinado que existe una relación entre ellas, donde se ha establecido que hasta un 79% de conversión puede lograrse con una altura de reactor de 10 cm y un flujo de 0.47 mL/min (Halim et al, 2009, pp. 710-716). El mismo estudio sugiere, que a velocidades menores, se obtiene un menor rendimiento de FAMEs debido a la resistencia a la transferencia de masa entre la enzima y la capa de líquido y glicerol en el transportador. De modo que es posible que la velocidad de flujo menor utilizada en el presente trabajo haya contribuido a que el porcentaje de conversión no alcanzara ni el 50%.

La configuración en dos etapas por otra parte, apenas mostró un incremento de 1.55% respecto a la configuración en una etapa, logrando transformar un 49.90% de TAGs a FAMEs. Este resultado (tabla 7) discrepa considerablemente del obtenido en la modelación (figura 13), donde se logró un porcentaje teórico de conversión de alrededor de 98%. Nuevamente, la velocidad de flujo utilizada en esta configuración (0.08 mL/min para el primer reactor, y 0.04 mL/min para el segundo), puede brindar una posible explicación al respecto.

Como se discutió en la sección anterior, una velocidad de flujo baja tiene efectos reductores en la actividad enzimática, aunque por otra parte, una velocidad demasiado alta, por ejemplo un flujo de 1.5 mL/min, evita que las cápsulas sean permeadas y por consiguiente, el contenido de FAMEs será reducido. Chen et al, (2006, p. 671), y Halim et al, (2009, p. 710-715), proponen utilizar un flujo de 1.2 mL/min y 0.57 mL/min respectivamente, para lograr niveles respectivos de conversión de 91% y 79%, flujos en cualquier caso muy superiores al utilizado en este trabajo. Cabe aclarar que el flujo utilizado en el

presente trabajo, fue calculado en relación al tiempo de residencia y al volumen del reactor (anexo 1), debido a que se estableció como fijo al tiempo de residencia (30 h) en todos los modos de operación, con el fin tener un parámetro disponible para comparar los porcentajes de conversión experimentales. Un aumento en la velocidad de flujo hubiera supuesto un tiempo de residencia menor, haciendo difícil la comparación sin este parámetro antes establecido.

Finalmente, es preciso mencionar que, a pesar de que los resultados experimentales difieran de los obtenidos por modelación, sería precipitado considerar desechar el modelo propuesto (figura 6), pues, si se observa la tabla 3, el valor que se asignó al flujo con el que se realizaron los modelos fue de 0.1, un flujo todavía superior al utilizado en la etapa experimental, lo que dio niveles de conversión superiores o iguales a 50% en PFR de I etapa (figura 12), y de cerca del 100% en PFR de II etapas (figura 13). De modo que es de esperar que si se utiliza una velocidad de flujo mayor, el nivel de conversión se verá incrementado. Las sugerencias que se hacen para este respecto se pueden observar en la sección de recomendaciones.

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 Conclusiones**

En este trabajo se procedió a diseñar un reactor enzimático para producir biodiesel utilizando lipasa comercial de *Rhizopus oryzae* inmovilizada en cápsulas de quitosano por medio de entrecruzamiento y enlace covalente con glutaraldehído, a partir del sustrato aceite de oliva.

Con la ayuda del software especializado para modelación Wolfram Mathematica® 8 for Students, tres modos de operación —batch, CSTR, PFR—, y dos configuraciones en el caso del PFR (I y II etapas); fueron construidos y se observó su comportamiento cinético. Se concluyó que el reactor con mayor eficiencia teórica de conversión de TAGs a FAMEs es el modo de operación PFR con configuración de dos etapas, con un rendimiento teórico de FAMEs superior a 90%, si bien el modo de operación batch brindó un resultado muy similar al obtenido del PFR configuración de I etapa (50%), el tiempo de reacción resultó ser mayor en el primero (alrededor de 200, comparado con el tiempo de residencia del PFR (20). El modo de operación CSTR desprendió los resultados más bajos en la simulación teórica (eficiencia teórica de 7%, y tiempo de residencia de 30), de modo que se omitió su construcción.

Utilizando materiales económicos y disponibles, como el acrílico, se construyeron los modos de operación batch y PFR I y II etapas para corroborar con aval experimental los resultados derivados de las simulaciones.

Basándose en métodos directos para medir el nivel de conversión de TAGs a FAMEs en los sistemas respectivos, a saber, medición del volumen de glicerol obtenido, en adición el cálculo de productividad volumétrica  $Q_p$ , se concluyó que el reactor batch es el reactor más eficiente para transformar TAGs a FAMEs, con un porcentaje de conversión de 74.31% y una  $Q_p$  de 29.32 g/L.h, mientras el PFR de I y II etapas obtuvo una conversión de 48.35%, con una  $Q_p$  de 7,91 g/L.h, y 49.90% con una  $Q_p$  de 11.58 g/L.h respectivamente. Tales resultados no son suficiente prueba para rechazar el modelo propuesto, pues la

$Q_p$  puede variar a favor del sistema continuo (PFR) si se toma en cuenta el tiempo perdido que supone la separación y recuperación de producto del reactor en sistemas discontinuos, además del tiempo que puede tomar volver a ensamblar el reactor para otra corrida. Adicionalmente, el nivel de conversión no solamente depende del comportamiento de la reacción en determinado modo de operación y de la configuración del reactor, ni exclusivamente del tiempo de residencia, sino también de variables experimentales como la cantidad (volumen) de sustrato vs la cantidad de enzima disponible, la velocidad de flujo con la que el sustrato ingresa al sistema, existencia de mecanismos de eliminación de productos secundarios, el tamaño del reactor, continuidad o discontinuidad del proceso, por mencionar algunos ejemplos.

## **5.2 Recomendaciones**

Se omitió deliberadamente el análisis de muchas interacciones que pueden influir notablemente en el comportamiento de la cinética enzimática en el sistema, por ejemplo, se recomienda realizar futuras simulaciones considerando la inhibición competitiva causada por la adición de metanol, el efecto que puede tener en el sistema el uso de solventes orgánicos, el efecto de la temperatura en la reacción, la formación de intermediarios como los diglicéridos y monoglicéridos, así como el tamaño de la partícula para evitar problemas relativos a la transferencia de masa y caída de presión, especialmente en reactores como el PFR.

Es recomendable profundizar en el análisis de los efectos que diversos modos de operación, pero tomando en consideración configuraciones más complejas, como por ejemplo múltiples etapas en cada uno, así como la presencia de flujos continuos y con recirculación, puedan tener en la eficiencia de conversión de TAGs a FAMEs.

El diseño ingenieril de los reactores de igual forma, puede ser ampliamente optimizado, especialmente en cuanto a la implantación de mecanismos de eliminación in situ de glicerol, reducción del daño y destrucción al transportador

(cápsulas). Igualmente es recomendable analizar el efecto que pueden tener distintos métodos de inmovilización, y transportadores enzimáticos, en la eficiencia de conversión de TAGs a FAMEs.

Se recomienda realizar nuevos experimentos considerando un mismo volumen de sustrato para cada tipo de reactor, y una velocidad de flujo mayor (entre 0.57 a 1.2 mL/min) en los reactores de flujo pistón, de modo que el modelo pueda ser puesto a prueba en base a tales optimizaciones operacionales en los reactores.

Para determinar de forma más exacta qué modo de operación convierte mayor cantidad de TAGs a FAMEs en un menor tiempo de residencia, se sugiere realizar mediciones del nivel de conversión tomando muestras cada cierto tiempo, las cuales pueden ser analizadas por equipos especializados que se valgan de metodologías cromatográficas.

Finalmente, se recomienda el uso de metodologías cuantitativas más precisas y fiables al momento de calcular el nivel de conversión de TAGs a FAMEs. Por ejemplo, se recomienda el uso de técnicas cromatográficas, como HPLC, debido a que existen protocolos sencillos donde no es necesaria la derivatización de los ácidos grasos para obtener una buena resolución en el cromatograma, y supone una economización considerable de gastos.

## REFERENCIAS

- Al-Zuhair, S., Wei Ling, F., Song Jun, L. (2007). Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. Semenyeh, Malasia. Elsevier.
- Atadashi, I, M., Aroua, M, K., Abdul Aziz, A, R., Sulaiman, N, M, N. (2012). The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. Kuala Lumpur, Malasia. Elsevier.
- Bailey, J. (1998). Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. Recuperado el 14 de febrero de 2015 de: [http://www.readcube.com/articles/10.1021%2Fbp9701269?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1](http://www.readcube.com/articles/10.1021%2Fbp9701269?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1)
- Bajpai, D., Tyagi, V, K. (2006). Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and Its Benefits. Kanpur, India. JOS.
- Biofuel.org.uk. (2010). Biofuels. The fuels of the future. Recuperado el 16 de noviembre de 2014 de: <http://biofuel.org.uk/>
- Blair, G. (2013). Titrating Oil to Make Biodiesel. Recuperado el 18 de Noviembre de 2014 de: <http://utahbiodieselsupply.com/titration.php>.
- Chattopadhyay, S., Karemore, A., Das, S., Deysarkar, A., Sen, R. (2010). Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: Standarization of process parameters and comparison of fuel characteristics. Kharagpur, India.
- Chen, G., Ying, M., Li, W. (2006). Enzymatic Conversion of Waste Cooking Oils Into Alternative Fuel- Biodiesel. Tianjin, China. Applied Biochemistry and Biotechnology.

- Chesterfield, D., Rogers, P, L., Al-Zaini, E., Adesina, A, A. (2012). Steady-state simulation of a novel extractive reactor for enzymatic biodiesel production. Sydney, Australia. Elsevier.
- Contreras, A, I., Sierra, V, E, F., Guerrero, F, C, A. (2013). Biodiesel Production from Waste Cooking Oil by Enzymatic Catalysis Process. Culiacán, México; Bogotá, Colombia. David Publishing.
- Dias Ribeiro, B., Machado de Castro, A., Zarur, C, M, A., Guimaraes, F, D, M. (2011). Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. Río de Janeiro, Brasil. Enzyme Research.
- Dong, L, C., Wang, G., Xiao, Y., Xu, Y., Zhou, X., Jiang, H., Luo, Q. (2011). Immobilization of Glucose Oxidase on a Novel Crosslinked Chitosan Support Grafted with L-Lysine Spacers. Chongqing, China. Biochemical Engineering.
- European Biodiesel Board. (2013). Statistics. The EU biodiesel industry. Recuperado el 10 de febrero de 2015 de: <http://www.ebb-eu.org/stats.php>
- Fjerbaek, L., Christensen, K, V., Norddahl, B. (2009). A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. Denmark. Biotechnology and Bioengineering.
- Ghaly, A, E., Dave, D., Brooks, M, S., Budge, S. (2010). Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. Halifax, Canadá. American Journal of Biochemistry and Biotechnology.
- Haas, M, J., Scott, K, M., Marmer, W, N., Foglia, T, A. (2004). In situ Alkaline Transesterification: An Effective Method for the Production of Fatty Acid Esters from Vegetable Oils. Pennsylvania, EUA. JAOCS.
- Hong, W, P., Park, J, Y., Min, K., Joo Ko, M., Park, K., Je Yoo, Y. (2011). Kinetics of glycerol effect on biodiesel production for optimal feeding of methanol. Seoul, Korea. Korean J. Chem. Eng.

- Illanes, A., Altamirano, C. (2008). *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*. Valparaiso, Chile. Springer.
- Jansri, S., Prateepchaikul, G. (2015). *The Verification of n Tank of Continuous Stirred Tank Reactor Estimation for Producing Methyl Ester from Mixed Crude Palm Oil by the Two-Stage Process*. Songkhla, Tailandia. UNINET.
- Janusz, G., Zelazna, K., Karwowska, A., Olba-Ziety, E. (2012). *Conceptual framework of bioethanol production from lignocellulose for agricultural profitability*. Olsztyn, Polonia: University of Warmia.
- Khalid, K., Khalid, K. (2011). *Transesterification of Palm Oil for the Production of Biodiesel*. Selangor, Malasia. Science Publications.
- Kumar, G., Kumar, D., Singh, S., Kothari, S., Bhatt, S., Singh, P. (2010). *Continuous Low Cost Transesterification Process for the Production of Coconut Biodiesel*. Najibabad, India. Energies.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V, K., Banerjee, R. (2009). *Enzymatic transesterification of Jatropha oil*. Kharagpur, India. BioMed Central.
- Leevijit, T., Wisutmethangoon, W., Pateepchaikul, G., Tongurai, C., Allen, M. (2006). *Trans-esterification of Palm Oil in Series of Continuous Stirred Tank Reactors*. Songkhla, Tailandia.
- Liu, S. (2013). *Bioprocess Engineering. Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design*. Syracuse, USA. Elsevier.
- Luković, N., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D. (2014). *Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives*. Belgrade, Servia. Intechopen,
- Macrae, A, R., Hammond, R, C. (1985). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Londres, Reino Unido. Taylor & Francis.

- Magalhaes, S. P., Falcao, P. W. C., Nogueira, L. S. C., Pessoa, F. L. P. (2010). The synthesis of biodiesel via enzymatic ethanolysis of the sunflower palm oils: kinetic modeling. Rio de Janeiro, Brasil. AIDIC.
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., Naik, S. N. (2004). Technical aspects of biodiesel production *by transesterification – a review*. Nueva Delhi, India. Elsevier.
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., de Castro, H. F. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. Sao Paulo, Brasil. Elsevier.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Rodwell, V. W. (2007). Harper Bioquímica Ilustrada. (17ª edición). México D.F, México. Manual Moderno.
- Murty, V. R., Bhat, J., Muniswaran, P, K, A. (2002). Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. Manipal, India. Biotechnol. Bioprocess. Eng.
- Nelson, L. D., Cox, M. M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. (4ª edición). New York, USA: Freeman.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. Beijing, China. Elsevier.
- Nisha, S., Karthick, A., Gobi, N. (2012). A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. Tamil Nadu, India. Chemichal Science Review and Letters.
- Pal, Ajay., Khanum, F. (2012). Covalent immobilization of xylanase on the surface of alginate –*glutaraldehyde beads decreases the 'catalytic efficiency' but provides 'low temperature stabilization' effect*. Mysore, India. Biochem Tech.
- Ranganathan, S. V., Narasimhan, L. S., Muthukumar, K. (2007). An overview of enzymatic production of biodiesel. Chennai, India. Elsevier.

- Ríos, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D., Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors- A review. Montpellier, Francia. Elsevier.
- Rivera-Pérez, C., García-Carreno, F. (2007). Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. La Paz, Baja California Sur, México. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S. (2006). Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. Salta, Argentina. Elsevier.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., Vargas, R. M. (1998). Transesterification of Vegetable Oils: a Review. Campinas, Brasil. Soc. Bras. Química.
- Sharma, R. (2012). Enzyme inhibition: Mechanisms and Scope, Enzyme Inhibition and Bioapplications. Tallahassee, USA. Intech.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. (2001). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Osaka, Japón. Elsevier.
- Su, E., Wei, D. (2008). Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. Qingdao, China. Elsevier.
- Takahashi, P. (2011). Simple Solutions for Our Biofuel Problem. Recuperado el 16 de noviembre de 2014 de: [http://www.huffingtonpost.com/patrick-takahashi/simple-solutions-for-our\\_b\\_146906.html#](http://www.huffingtonpost.com/patrick-takahashi/simple-solutions-for-our_b_146906.html#).
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. Zhengzhou, China. Elsevier.
- Taylor, K. (2002). Enzyme Kinetics and Mechanisms. Birmingham, USA. Kluwer Academic Publishers.

- Thakur, S. (2012). Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. Shimla, India. International Journal of Scientific & Engineering Research Volume 3.
- Thayer School of Engineering at Dartmouth. (2003). Reacting Systems. Nueva Hampshire, EUA: Dartmouth College.
- Tischer, W., Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. Penzberg, Germany. Springer.
- Tufvesson, P., Fu, W., Skibsted, J, J., Woodley, J, M. (2010). Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. Lyngby, Dinamarca. Elsevier.
- UNCTAD. (2009). The Biofuels Market: Current Situation and Alternative Scenarios. Ginebra, Suiza.
- Velasteguí, E. (2014). Optimización de condiciones de inmovilización química de lipasa de *Rhizopus arrhizus* en soportes de quitosano. Quito, Ecuador. UDLA.
- Vembanur, S., Lakshmi, S., Muthukumar, K. (2007). An overview of enzymatic production of biodiesel. Chennai, India. Elsevier.
- Yücel, S., Terzioğlu, P., Özçimen, D. (2013). Lipase Applications in Biodiesel Production. Estambul, Turquía. Intech.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

Cálculo de la velocidad de flujo tomando en consideración un tiempo de residencia  $\tau$  de 30 horas.

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\tau},$$

$$D = \frac{1}{1800 \text{ min}} = 5.55 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

$$F = D \times V = (5.55 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}) \times (50 \text{ mL}) = \boxed{0.02 \text{ mL / min}}$$

Este flujo fue utilizado para el PFR de I etapa.

Para el PFR de II etapas, el cálculo fue el siguiente:

Primer reactor,  $\tau$ : 10 h:

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\tau},$$

$$D = \frac{1}{600 \text{ min}} = 1.66 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$F = D \times V = (1.66 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}) \times (50 \text{ mL}) = \boxed{0.08 \text{ mL / min}}$$

Para el segundo reactor,  $\tau$ : 20 h:

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\tau},$$

$$D = \frac{1}{1200 \text{ min}} = 8.33 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

$$F = D \times V = (8.33 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}) \times (50 \text{ mL}) = \boxed{0.04 \text{ mL / min}}$$

## Anexo 2



**ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA**  
**La Española**  
750 ML

**INFORMACION NUTRICIONAL**

Tamaño por porción 15ml/14g (1 cucharada)  
Porciones por envase 50

Cantidad por porción

	Porción 14 g		Por 100 g	
Energía	545kJ (130 Cal.)		3771 kJ (900 Cal.)	
Energía Grasa	545kJ (130 Cal.)		3771 kJ (900 Cal.)	
		% VD*		%VD*
Grasa Total	14 g	22%	100 g	154%
Grasa Sat.	2 g	10%	14 g	70%
Grasa Trans.	0 g		0 g	
Grasa Monounsaturada	11 g		77 g	
Grasa Poliinsaturada	1 g		9 g	
Colesterol	0 mg	0%	0 mg	0%
Sodio	0 mg	0%	0 mg	0%
Carb. totales	0 g	0%	0 g	0%
Proteínas	0 g	0%	0 g	0%

\*Los Porcentajes de Valores Diarios están basados en una dieta de 8380kJ (2000 Cal.)

ATENCIÓN: CONSERVAR A TEMPERATURA AMBIENTE Y AL ABRIGO DE LA LUZ  
INGREDIENTES: ACEITE DE OLIVA

a. Aceite de olive extra virgen La Española, el sustrato utilizado para realizar la transesterificación de ácidos grasos en este trabajo.

### Anexo 3

A continuación, se muestra como se calculó el volumen de glicerol esperado de la producción de biodiesel a partir de aceite de oliva.

Primeramente, hay que considerar la composición del aceite de oliva:

<b>Composición del aceite de oliva</b>	
Ácido linolénico	1%
Ácido esteárico	2%
Ácido linoléico	10%
Ácido palmítico	12%
Ácido oléico	75%

Después de la transesterificación, los ácidos grasos son convertidos en metil ésteres de ácidos grasos. En la siguiente tabla, se detalla el peso molecular de cada uno:

<b>FAMEs</b>	<b>PM (g/mol)</b>
Metil linolenato	292.46
Metil estereato	298.50
Metil linoleato	294,47
Metil palmitato	270.45
Metil oleato	296.49

Ahora bien, teniendo en cuenta que en la reacción de transesterificación, se producen 3 moléculas de FAMEs y 1 molécula de glicerol; que la densidad del biodiesel y del glicerol es 0.88 g/mL y 1.26 g/mL respectivamente; y de la composición de los FAMEs en el biodiesel de aceite de oliva, se obtuvo que el volumen total de glicerol presente en 100 mL de biodiesel es:

<b>Volumen de glicerol (mL)</b>	<b>En biodiesel con % FAMEs</b>
0.07	1% de metil linolenato
0.14	2% de metil estereato
0.72	10% de metil linoleato
0.95	12% de metil palmitato
5.40	75% de metil oleato
$\Sigma=7.28$	

Tomando los 7.28 mL de glicerol como valor total o volumen de glicerol esperado, se obtuvo el nivel de conversión para cada modo de operación utilizando una regla de tres simple, tal como se constata en el siguiente ejemplo:

$$\%conversion_{PFR I} = \frac{3.52mL_{Glicerol Obtenido} \times 100}{7.28mL_{Glicerol Esperado}} = 48.35$$

Para calcular el nivel de conversión en el reactor discontinuo de tanque agitado, debido a que se utilizó 30 mL de sustrato, se calculó que el volumen de glicerol esperado es de 2.18 mL, y se obtuvo el porcentaje de conversión de TAGs a FAMEs utilizando la misma relación mostrada en la ecuación anterior.